Untersuchungen zur Funktion von membrangebundenen und freien Ribosomen aus Saccharomyces

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Elisabeth Schneider
aus Berlin

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0018

Untersuchungen zur Funktion von membrangebundenen und freien Ribosomen aus Saccharomyces

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Elisabeth Schneider
aus Berlin

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1 Referent: Prof. Dr. E -R. Lochmann

2. Referent: Prof. Dr. K. Graszynski

Tag der mündlichen Prüfung: 14 September 1977

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	5
2.1	Lösungen	5
2.2	Hefestämme	6
2.3	Kultivierungsbedingungen	6
2.4	Ernte der Zellen	7
2.5	Homogenisation	7
2.6	Isolierung und Bestimmung freier und membrangebundener Ribosomen	7
2.7	Messung der zellfreien Polypeptid-Synthese in einem poly-U-abhängigen System	9
2.8	Sedimentationsanalysen	10
2.9	Durchführung der Markierungsversuche mit Uracil-2-^{14}C bzw. Aminosäure-^{14}C-Gemisch	10
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	12
3.1	Entwicklung einer Standard-Methode zur Isolierung und Bestimmung biologisch aktiver membrangebundener und freier Ribosomen aus Hefe	12
3.1.1	Vergleich verschiedener Homogenisationsmethoden	14
3.1.2	Quantitative Gewinnung von freien Ribosomen aus dem Homogenatniederschlag	17
3.1.3	Test auf optimale Ablösung membrangebundener Ribosomen von Membranen durch Detergentien	18
3.1.4	Test der quantitativen Sedimentation im Stufengradienten	20
3.1.5	Isolierungsschema	22
3.2	Charakterisierung membrangebundener und freier Ribosomen	24
3.2.1	Proteinbiosynthese in vitro	24

Seite

3.2.2	Sedimentationsanalyse der Ribosomenfraktionen	27
3.2.3	Sedimentationsanalyse der 80 S-Ribosomen bei steigender KCl-Konzentration	28
3.3	Untersuchungen zur Funktion von membrangebundenen und freien Ribosomen in synchron wachsenden Hefezellen	30
3.3.1	Synchronisation	31
3.3.2	Die Messung der Verdopplungsperioden in synchron wachsenden Hefekulturen	32
3.3.2.1	Zellzahl, Zelltrockenmasse und optische Dichte	32
3.3.2.2	Die Verdopplungszahl	35
3.3.3	Proteinbiosynthese während eines Zellzyklus	39
3.3.4	RNS-Synthese während eines Zellzyklus	42
3.3.5	Die Verteilung von membrangebundenen und freien Ribosomen während eines Zellzyklus	44
3.3.6	Die Ribosomenverteilung in Stämmen verschiedenen Ploidiegrades	44
3.3.7	Versuche zu Funktion und turn-over	46
3.3.7.1	Korrelation von Ribosomenverteilung und Proteinbiosynthese	46
3.3.7.2	Uracil-Markierung der Ribosomenfraktionen	48
3.4	Entwicklung und Diskussion eines turn-over-Modells für membrangebundene und freie Ribosomen in Saccharomyces	52
4.	ZUSAMMENFASSUNG	59
5.	LITERATUR	61

EINLEITUNG

Die Entdeckung von Ribosomen sowie erste Vermutungen über ihre Beteiligung an der Proteinbiosynthese gehen zurück auf Untersuchungen an Rattenleber, Erythrocyten und Retikulocyten [26, 57]. Die darauffolgenden grundlegenden Arbeiten über den Mechanismus der Proteinbiosynthese und die Rolle der Ribosomen in diesem Prozeß wurden hauptsächlich an Escherichia coli durchgeführt. An E. coli Ribosomen werden heute noch die wichtigsten Erkenntnisse über Ribosomen-Strukturen gewonnen [vgl. z. B. 55]. Nach dem bisherigen Kenntnisstand gibt es in Prokaryonten nur eine Art von Ribosomen ; ihre Protein-Zusammensetzung kann sich während verschiedener Funktionsphasen geringfügig ändern [53, 55]. In einer neueren Arbeit [36] wurden jedoch auch in E. coli membrangebundene Ribosomen nachgewiesen. Später durchgeführte Untersuchungen mit Eukaryontenzellen zeigten, daß bei diesen wesentlich stärker kompartimentierten und komplexeren Zellen mindestens zwei Arten von Ribosomen vorliegen: den Hauptanteil bilden die 80 S-Ribosomen, in Größe, Aufbau und Zusammensetzung verschieden von den 70 S-Ribosomen, die - in geringerem Anteil - in Mitochondrien und Chloroplasten gefunden wurden. Die 70 S-Ribosomen synthetisieren mit mRNS, die an der speziellen Mitochondrien- bzw. Chloroplasten-DNA kopiert wird, verschiedene Proteine zum Aufbau dieser Organellen. Elektronenoptische und biochemische Ergebnisse zeigten außerdem, daß die Ribosomen bzw. Polysomen in Eukaryonten sowohl frei im Zytoplasma als auch gebunden an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums vorliegen können [34]. Obwohl sich diese beiden Ribosomenarten morphologisch und biochemisch wenig oder gar nicht unterscheiden [7, 10, 17, 21], wird von zahlreichen Autoren angenommen, daß sie unterschiedliche Funktionen besitzen. Insbesondere wird die Hypothese vertreten, daß membrangebundene Ribosomen vorwiegend Membranproteine und sekretorische Proteine synthetisieren, während die Synthese der intrazellulären Pro-

teine an den freien Ribosomen stattfindet [3, 8, 20, 35, 46, 51, Zusammenfassung vgl. 38]. Gestützt wurde diese Hypothese hauptsächlich durch folgende Beobachtungen: die für die Synthese von Sekretproteinen spezialisierten Zellen, z.B. Leber- oder Drüsenzellen, haben ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum und auch einen sehr hohen Prozentsatz an membrangebundenen Ribosomen [48]. Dagegen weisen sich schnell teilende Zellen, z.B. Embryonal- und Tumorzellen, einen wesentlich höheren Anteil an freien Ribosomen auf [48]. Blobel [1] nimmt an, daß mRNS, welche sekretorische Proteine kodiert, sogenannte " signal"-Codone zur Bindung der naszierenden Peptidkette an die Membran besitzt (" Signal-Hypothese"). Außerdem schloß er aus Untersuchungen an Kaninchen-Retikulocyten auf die Existenz eines " Detachment-Faktors", der die Membranbindung der Polysomen nach vollendeter Proteinsynthese löst [6].

Zweifel an der Hypothese einer unterschiedlichen Synthesefunktion von freien und membrangebundenen Ribosomen tauchten u.a. deshalb auf, weil auch in nicht sekretorischen Zellen membrangebundene Ribosomen gefunden wurden (vgl. z.B.[51]).
Darüberhinaus gibt es zwar Hinweise, daß bestimmte Proteine an membrangebundenen Ribosomen synthetisiert werden, jedoch fehlen eindeutige Beweise für eine spezifische Syntheseleistung der freien Ribosomen.

In neueren Arbeiten [vgl. z.B. 49], die z.T. auch mit Saccharomyces-Zellen durchgeführt worden sind [4], wird angenommen, daß es sich bei membrangebundenen und freien Ribosomen nicht um prinzipiell unterschiedliche Ribosomenarten handelt, sondern daß ein Übergang zwischen beiden Arten während des Metabolismus stattfindet, daß z.B. eine Ribosomenart Vorläufer der anderen sein könnte (turn-over-Modell).

Mechler und Vassalli [29] haben für einen derartigen Ribosomenzyklus in Myelomazellen ein Modell vorgeschlagen, nach welchem Proteinsynthese an membrangebundenen Ribosomen stattfindet.

Um eine turn-over-Hypothese nachzuprüfen, scheinen insbesondere nicht-sekretorische Zellen geeignet, zu denen auch Hefen gehören.

Obwohl Hefezellen zu den einfachen Eukaryonten gehören, sind bisher im Vergleich zu Säugerzellen relativ wenige Untersuchungen über freie und membrangebundene Ribosomen in diesem Organismus bekannt. Dies war ebenfalls Anlaß, in der vorliegenden Arbeit die beiden Ribosomenarten in Saccharomyces eingehend zu untersuchen. Folgende Schwerpunkte wurden gesetzt: (1) Entwicklung einer Standardmethode zur Isolierung von freien und membrangebundenen Ribosomen aus Hefezellen, (2) Charakterisierung der Ribosomenfraktionen, (3) Experimente zur Funktion der freien und membrangebundenen Ribosomen, (4) Entwicklung eines turn-over Modells anhand der gefundenen eigenen Ergebnisse.

Zu (1): Ausgehend von der Methode von Blobel und Potter [2] wurde eine Reihe von Isolierungsparametern untersucht und eine für Hefezellen geeignete Methode entwickelt.

Zu (2): Die Ribosomenfraktionen wurden dann mit verschiedenen Methoden charakterisiert: Es wurde das Verhalten im Dichtegradienten unter Standardbedingungen und nach Einfluß hoher KCl-Konzentrationen untersucht und die biologische Aktivität der Ribosomenfraktionen im zellfreien System bei der Proteinsynthese getestet.

Zu (3): In synchron wachsenden Hefekulturen wurde die prozentuale und absolute Verteilung der freien und membrangebundenen Ribosomen untersucht. Parallel dazu wurde ihre Proteinsyntheseleistung gemessen. Diese Versuche liefern einerseits Informationen über einen möglichen turn-over zwischen den beiden Ribosomenarten während des Zellzyklus und andererseits über ihre Funktion in der Proteinbiosynthese.

In weiteren turn-over-Experimenten wurde geprüft, ob nach hoher Markierung der Zellen mit radioaktivem Uracil und nachfolgender Inkubation in nicht aktivem Medium ein Wechsel der spezifischen Radioaktivität zwischen den verschiedenen Ribosomen-Fraktionen stattfindet. Pulsmarkierungen mit radioaktivem Uracil bzw. Aminosäuregemisch während verschiedener Phasen des Wachstums sollten weitere Aussagen darüber bringen, welche Ribosomenart momentan an der Proteinbiosynthese beteiligt ist und ob die Ribosomenarten gleichzeitig oder nacheinander markiert werden.

Zu (4): Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde ein turn-over-Modell entwickelt, das sich auf die Formation des Membran-Polysom-Komplexes konzentriert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Lösungen

Puffer = TKM-Puffer:

33 mM Tris (Trishydr[illegible]ethylaminomethan, Fa. Merck, Darmstadt)

5 mM $MgCl_2$ (Fa. Merck)

50 mM KCl (Fa. Merck)

6 mM 2-Mercaptoäthanol (Fa. Serva, Heidelberg)

0.25 mM EDTA-Titriplex III (Fa. Merck)

pH 7.5

Glycerin-Puffer: 20 % (v/v) Glycerin in TKM-Puffer

Detergentien:

Brij 58 (Polyäthylenglykolmonostearyläther) (Fa. Serva)

Triton X-100 (Octylphenol-polyäthylenglykoläther) (Fa. Serva)

Natriumdesoxycholat (NaDOC) (Fa. Merck)

Radioaktive Lösungen:

Uracil-2-^{14}C , 40 Ci/Mol

^{14}C-Phenylalanin, 50 Ci/Mol

^{14}C-Aminosäuregemisch, ca. 100 Ci/Mol.

Alle radioaktiven Produkte wurden bezogen vom Isotopen Dienst West, Sprendlingen.

Scintillator-Flüssigkeit:

4 g Omnifluor (Fa. New England Nuclear Chemicals, Boston, Mass. USA) in 1 l Toluol oder

8 g Omnifluor in 1 l Dioxan.

Nährmedium:

2 % Glukose (Fa. Serva, Heidelberg)

1 % Difco Yeast Extrakt (Fa. Difco, Detroit, USA)

0.5 % Pepton (Fa. Merck)

2.2 Hefestämme

Wenn nichts anderes angegeben, wurde der tetraploide Stamm 2200 [37] verwendet. Daneben wurden der haploide Stamm 1000 und der diploide Stamm 211 [25] untersucht.

2.3 Kultivierungsbedingungen

Die Zellen wurden bei 30°C unter Belüftung durch Schütteln oder Rühren Nährmedium kultiviert. Die Anzucht der Hefen erfolgte zunächst 500 ml Nährmedium (Vorkultur) bis zur stationären Phase (24 - 48 h). Die Vorkultur wurde abzentrifugiert, die Zellen in 5 l frisches ollmedium von 30°C in einen Fermentor überführt und unter Rühren weitergezüchtet. Der Anfangstiter betrug ca. $5,8 \cdot 10^6$ Zellen (OD = 0,08). Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte der Kultur in einem Lange-Kolorimeter unter Verwendung eines Grünfilters verfolgt.

Der Zelltiter wurde durch Auszählen verdünnter Proben in einer Hämacytometerkammer nach Bürker-Türk bestimmt. Die Bestimmung der Zelltrockenmasse pro ml Kultur erfolgte, indem je 20 ml Kultur an verschiedenen Punkten des Wachstums entnommen, 48 Stunden lang gefriergetrocknet und dann ausgewogen wurden.

Der Synchronisationsgrad der Kultur wurde mikroskopisch verfolgt.

Unter den genannten Zuchtbedingungen ist der Mitochondriengehalt der Zellen wegen der relativ schwachen Sauerstoffzufuhr gering.

.4 Ernte der Zellen

Nach Erreichen der gewünschten Wachstumsphase wurde das Wachstum der Kultur durch Zufügen von Eis und sofortiges Abzentrifugieren der Zellen in der Kühlzentrifuge gestoppt. Die Zellmasse wurde dann mit Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert (" Waschvorgang"). Dies wurde dreimal wiederholt; schließlich wurden die Zellen in Glycerin-Puffer resuspendiert.

.5 Homogenisation

In der French-Press erfolgte die Homogenisation nach Einfrieren der Zellsuspension in flüssigem Stickstoff bei einem Druck von 16 000 lb/ $inch^2$ durch eine Düse von 1,4 mm Innendurchmesser.
Zur Homogenisation im Braun-Homogenisator wurde die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Glasperlen (0.45 mm $\varnothing$) versetzt und unter CO_2-Kühlung 1.5 min. geschüttelt.

.6 Isolierung und Bestimmung freier und membrangebundener Ribosomen

Die Standard-Isolierung der freien und membrangebundenen Ribosomen erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach dem in 3.1.5 angegebenen Schema (Abb. 4), das hauptsächlich auf der Methode von Blobel und Potter [2] basiert.

Das Homogenat wurde 5 Minuten bei 6 000 x g zentrifugiert, 3 mal gewaschen (s.o.) und schließlich bei 17 500 x g im Sorvall S 34 Rotor nochmals 20 Minuten zentrifugiert. Die Niederschläge wurden vereint, im gleichen Volumen Puffer resuspendiert und 30 Minuten bei 22°C unter Rühren in 1 % Triton X 100 (Endkonzentration) inkubiert. Daraufhin wurde die Suspension bei 6 000 x g abzentrifugiert und 3 mal mit Puffer gewaschen, dann einmal 20 Minuten bei 17 500 x g abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand enthält die ehemals an " grobe " Membranpartikel (sedimentierbar bei 17 500 x g) gebundenen Ribosomen. Diese Fraktion wird " RF_1 " genannt.

Die Überstände nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer und Mitochondrien wurden vereint und eine Hälfte dieses Gesamtüberstandes ebenfalls 30 Minuten bei 22°C in 1 % Triton X 100 inkubiert. Wurden die Ribosomen später in biologischen Tests eingesetzt, erfolgten die Triton-Inkubationen bei 4°C. Die hieraus erhaltene Fraktion wird " RF_2 " genannt.

Der unbehandelte Teil des Gesamtüberstandes enthält die freien Ribosomen sowie " rauhe" und " glatte" Membranpartikel, (" RF_3 "), während die RF_2-Fraktion freie und ehemals an " kleine" Membranpartikel (nicht sedimentierbar bei 17 500 x g) gebundene Ribosomen enthält. Von sämtlichen Fraktionen wurden je 4 ml auf einen Sukrose-Stufengradienten (je 4 ml 2 M bzw. 0.5 M Sukrose in TKM-Puffer) aufgetragen und 22 Stunden bei 105 000 x g in einem Beckman Ti 50 Rotor zentrifugiert. Freie und ehemals membrangebundene Ribosomen werden sedimentiert, die " rauhen" Membranen (noch mit Ribosomen besetzt) in der RF_3-Fraktion banden an der Grenze der beiden Sukroseschichten (" RF_4 ").

Die Ribosomenniederschläge wurden in Puffer resuspendiert und nochmals bei 150 000 x g 90 Minuten abzentrifugiert, ebenso die RF_4-Fraktion, nachdem sie vorsichtig mit einer Spritze aufgenommen und in

Puffer suspendiert worden war. Dann wurden die Sedimente sämtlicher Fraktionen zu weiteren Untersuchungen in je 3 ml Puffer aufgenommen. Der RNS-Gehalt wurde mit der Orcinol-Methode, der Proteingehalt nach Lowry bestimmt. Außerdem wurden die Absorptionen bei 260 und 280 nm bestimmt.

.7 Messung der zellfreien Polypeptid-Synthese in einem poly-U-abhängigen System

Die Gewinnung der Faktoren zur zellfreien Polyphenylalanin-Synthese wurde von H. Lother beschrieben [27].

Inkubationsansatz: 100 µl

$MgCl_2$	7,6	mM
Tris-HCl	33	mM
Mercaptoäthanol	6,6	mM
KCl	55	mM
Phosphoenolpyruvat	6	mM
GTP	0,5	mM
ATP	1,5	mM
Phosphoenolpyruvatkinase	2	µg
^{14}C-Phenylalanin	5	µCi/ml, 100 Ci/Mol
Ribosomen	1,6	$A_{260\ nm}$ Einheiten
Überstandsenzyme	49	µg
tRNS	3,8	$A_{260\ nm}$ Einheiten
Poly-U	50	µg

Die Inkubation erfolgte bei 30°C 60 Minuten. Die Reaktion wurde durch Zugabe eiskalter 5%iger TCA gestoppt, dann wurde in TCA 15 Minuten gekocht und schließlich der Einbau von ^{14}C-Phenylalanin in das unlösliche Material gemessen. Die Messung erfolgte nach Filtration durch Membranfilter (Schleicher und Schüll, Typ GF 92) in 5 ml Scintillatorflüssigkeit im Beckman Scintillationszähler.

2.8 Sedimentationsanalysen

Die Sedimentationsanalysen der isolierten Polysomen wurden in einem linearen Sukrosegradienten (10-50%, w/v) im SW 27 Rotor bei 27 000 upm 4,5 Stunden und 0°C durchgeführt. Es wurden 5,5 $A_{260\ nm}$ Einheiten aufgetragen. Die Sedimentationsanalysen der 80 S Ribosomen bei steigender KCl-Konzentration (50 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM und 1 000 mM) in linearen Sukrosegradienten (10-50%, w/v) erfolgte im SW 41 Rotor, 15 Stunden bei 18 000 upm und 14°C; dazu wurden je 10-12 $A_{260\ nm}$ Einheiten auf die Gradienten aufgetragen.
Die Messung der Gradienten wurde in einer Durchflußküvette im Gilford-Spektrometer bei 260 nm durchgeführt.

2.9 Durchführung der Markierungsversuche mit Uracil-2-^{14}C bzw. Aminosäure-^{14}C-Gemisch

a] Die Zellen wurden mit radioaktivem Uracil 48 Stunden bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert; dann wurden die Zellen in inaktives Medium gegeben und nach verschiedenen Zeitabschnitten die Abnahme der spezifischen Radioaktivität der Ribosomen nach ihrer Isolierung festgestellt.

b] Es wurden Pulsmarkierungen mit Uracil-2-^{14}C (30 Minuten) bzw. mit Aminosäure-^{14}C-Gemisch (7 Minuten) zu verschiedenen Phasen des Wachstums durchgeführt. Mit Aminosäure-^{14}C-Gemisch wurde mit sehr kurzen Pulsen markiert, um in diesem Stadium die Markierung neusynthetisierter Proteine zu erfassen. Mit Uracil-^{14}C wurde mit einem 30 Minuten Puls gearbeitet, um hauptsächlich eine Markierung der ribosomalen RNS zu erreichen. Die Messung der Radioaktivität erfolgte wie in Kapitel 2.7 angegeben.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Entwicklung einer Standard-Methode zur Isolierung und Bestimmung biologisch aktiver membrangebundener und freier Ribosomen aus Hefe

Eine Isolierungs- und Bestimmungsmethode von freien und membrangebundenen Ribosomen, die Ergebnisse zur Aufklärung von Eigenschaften und Funktion dieser Ribosomenarten liefern soll, muß besonders zwei Kriterien erfüllen: sie muß erstens quantitatives Arbeiten ermöglichen und sollte zweitens so einfach wie möglich sein, um viele Versuchspunkte in relativ kurzer Zeit nebeneinander bearbeiten zu können.

Da in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben worden sind, die zudem überwiegend Isolierungsmethoden aus Säugerorganen betreffen (meist Rattenleber), wurde als erster Teil dieser Arbeit untersucht, welche Methode sich für die Isolierung von freien und membrangebundenen Ribosomen aus Saccharomyceszellen als die günstigste erweist. Ausgehend von der Methode von Blobel und Potter [2] wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf die Isolierungsergebnisse untersucht. Es wurden getestet: der Einfluß der Homogenisierungsart der Zellen, die Detergenzien, ihre Konzentration, die Temperatur und Dauer der Detergentienbehandlung, die Zentrifugationszeiten sowie der Einfluß von Waschvorgängen. In Kontrollexperimenten wurde nach Markierung der Ribosomen mit Uracil-2-^{14}C der Verbleib der Ribosomen in den jeweiligen Fraktionen geprüft.

Das Isolierungsschema für Rattenleber von Blobel und Potter (Abb. 1) wird im Folgenden noch einmal kurz dargestellt:

Das Homogenat wird fraktioniert zentrifugiert, der Mitochondrienüberstand auf einen Sukrose-Stufengradienten aufgetragen und nach 22stündiger Zentrifugation bei 105 000 x g die freien Ribosomen sedimentiert. Der Niederschlag aus dem Homogenat wird mit Detergens (NaDOC) behandelt, abzentrifugiert und der erhaltene Überstand zur Sedimentation

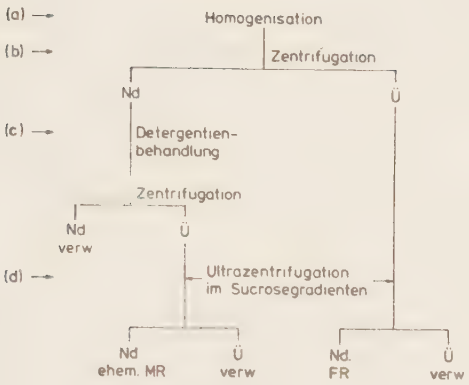

Abb. 1: Isolierungsschema für membrangebundene und freie Ribosomen aus Rattenleber, nach Blobel und Potter [2]. Die Präparationsschritte a, b, c, d wurden in der vorliegenden Arbeit überprüft.
Nd. = Niederschlag, Ü = Überstand, verw. = verworfen, ehem. MR = durch Detergens abgelöste, ehemals membrangebundene Ribosomen, FR = freie Ribosomen.

der nunmehr ehemals membrangebundenen Ribosomen ebenfalls in einem Stufengradienten zentrifugiert. Rauhe und glatte Membranvesikel banden an der Grenzfläche der beiden Sukrose-Schichten der nicht mit Detergens behandelten Proben.

In diesem Isolierungsschema gibt es für die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Ergebnisse folgende kritische Punkte (vergleiche Abb. 1):

a] Die Homogenisation sollte die Zellen möglichst quantitativ aufbrechen, aber membrangebundene Ribosomen nicht von den Membranen ablösen.

b] Nach der Zentrifugation des Homogenats muß gewährleistet werden, daß die freien Ribosomen quantitativ in den Überstand gelangen. Deshalb wurde die hierzu notwendige Anzahl von "Waschgängen" (s. Material und Methoden) ermittelt.

c] Die Detergensbehandlung muß möglichst die Ablösung aller Ribosomen von den Membranen verursachen, darf aber die Ribosomen nicht angreifen.

d] Nach der Stufengradient-Zentrifugation sollten alle freien und durch Detergens-Behandlung von Membranen abgelösten Ribosomen in dem entsprechenden Niederschlag vorhanden sein. Alle - bei nicht mit Detergens behandelten Fraktionen - noch membrangebundenen Ribosomen sollten an der Grenzschicht zwischen 2 M und 0,5 M Sukrose lokalisiert sein. Dies wurde anhand der Zentrifugationsdauer getestet.

In den folgenden Kapiteln werden die Testergebnisse der oben genannten Präparationsschritte gezeigt.
Die gemessene Verteilung der membrangebundenen und freien Ribosomen kann nur dann mit der tatsächlichen Verteilung übereinstimmen, wenn mögliche fehlerhafte Einflüsse eliminiert werden. Fehlerquellen liegen besonders in Homogenisationsgrad und -art sowie der nachfolgenden Zentrifugation.

3.1.1 Vergleich verschiedener Homogenisationsmethoden

Ein unterschiedlicher Homogenisationsgrad liefert entsprechend unterschiedlich große Membranteile des endoplasmatischen Retikulums [2]. Demzufolge ist der Anteil an rauhen Membranpartikeln im Mitochondrien-Überstand und im Niederschlag unterschiedlich, so daß nur Ergebnisse

vergleichbar sind, bei denen von gleicher Homogenisation und Zentrifugation ausgegangen wurde. Darüber hinaus wird bei Blobel und Potter eine wechselseitige Kontamination der einzelnen Fraktionen mit membrangebundenen bzw. freien Ribosomen nicht ausgeschlossen, da die membrangebundenen Ribosomen werden dort nur aus sedimentierbarem Material bestimmt. Ob dies bei Saccharomyces ebenfalls der Fall ist, wurde hier überprüft. Um mit einiger Sicherheit sämtliche membrangebundenen Ribosomen zu erfassen, wurden sowohl der Überstand als auch der Niederschlag der 17 500 x g - Zentrifugation mit Deter[illegible] behandelt und daraus quantitativ die Ribosomen isoliert.
Es wurde eine relativ grobe Aufschließungsmethode der Zellen im Braun-Homogenisator mit der schonenderen Methode in der French-Press Zelle verglichen.
Eine weitere mögliche Methode, die enzymatische Beseitigung der Zellwand von Hefezellen mit Schneckenenzym und anschließende Lysis wurde hier nicht angewandt, da diese Methode nur bei Zellen in bestimmten Phasen des logarithmischen Wachstums einen quantitativen Aufschluß der Zellen ermöglicht.
Bei der Wahl der Homogenisationsmethode wurden besonders die folgenden Kriterien berücksichtigt:

a] Der Homogenisationsgrad der Zellen: er liegt unter den vorliegenden Bedingungen nach der Homogenisation im Braun-Gerät bei mehr als 99 %. Bei Benutzung der French-Press kann nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff oder in Trockeneis ein Homogenisationsgrad von etwa 60 % erzielt werden. Diese Zahlen sind durch mikroskopische Kontrollen ermittelt worden.

Da der Homogenisationsgrad bei einzelnen Versuchen bei Verwendung der French-Press sehr unterschiedlich sein kann, ist ein quantitativer Vergleich der Ergebnisse in diesem Fall sehr erschwert. Für Versuche, bei denen die Verteilung der Riboso-

men in den einzelnen Fraktionen nur qualitativ gemessen werden soll, ist die French-Press-Methode geeignet. Wenn man quantitative Aussagen machen will, ist nur der Zellaufschluß durch den Braun-Homogenisator anwendbar.

b] Die Auswirkung der Homogenisationsart auf den Ribosomengehalt in den verschiedenen Fraktionen: Unter den genannten Bedingungen hat sich der Ribosomengehalt der RF_2 [1] - Fraktion gegenüber dem der RF_1 [1] - Fraktion etwas erhöht, wenn anstelle der French-Press der Braun-Homogenisator eingesetzt wurde. Der Gesamtgehalt an membrangebundenen Ribosomen blieb jedoch etwa gleich.

Hieraus kann geschlossen werden, daß durch die Braun-Homogenisierung das endoplasmatische Retikulum zwar in kleinere Fragmente zerschlagen, die Membran-Ribosomenbindung hierbei aber nicht gelöst wird. Mit der Homogenisationsart kann demnach auch nicht zwischen unterschiedlich " fest " gebundenen Ribosomen unterschieden werden. Wohl aber zeigt dieses Ergebnis die Notwendigkeit, auch den Überstand auf membrangebundene Ribosomen hin zu untersuchen.
Eine stärkere Zerstörung des Polysomenverbandes mit dem Braun-Homogenisator stört hier nicht, da Polysomen und Ribosomen zusammen bestimmt werden. Bei der Isolierung mit nachträglicher Charakterisierung der Ribosomen durch Dichtegradientenzentrifugation wurde für die qualitativen Versuche der schonendere Aufschluß mit der French-Press bevorzugt.

---

[1] Definition von RF_1 und RF_2 s. Abb. 4, Kapitel 3.1.5

Quantitative Gewinnung von freien Ribosomen aus dem Homogenatniederschlag

Um eine Kontamination der RF_1-Fraktion mit freien Ribosomen weitgehend auszuschließen und damit eine quantitative Erfassung beider Ribosomenarten zu gewährleisten, wurde festgestellt, wieviele Waschgänge zur Entfernung von freien Ribosomen aus dem Homogenatniederschlag notwendig sind. Die zu jedem Waschgang verwendete Puffermenge entsprach dem Volumen des Niederschlages. In jedem aus den einzelnen Waschgängen erhaltenen Überstand wurde der Ribosomengehalt bestimmt.

Abb. 2 zeigt, daß nach dem 4. Waschgang 0,5%, nach dem 5. nur noch 0,2 % der gesamten freien Ribosomen im Wasch-Überstand nachzuweisen sind. Im folgenden wurden vier Waschgänge als ausreichend betrachtet, um den Fehler insgesamt kleiner als 2 % zu halten.

Weitere Waschgänge sind nicht sinnvoll, da dann die Suspensionen der freien Ribosomen zu stark verdünnt und dadurch die quantitative Bestimmung fehlerhaft würde.

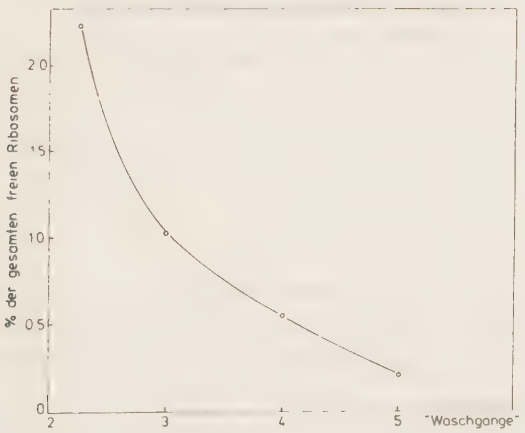

Abb. 2: Die im Überstand verbliebenen freien Ribosomen in Abhängigkeit von der Anzahl der "Waschgänge" (Definition s. Material und Methoden).

3.1.3 Test auf optimale Ablösung membrangebundener Ribosomen von Membranen durch Detergentien

Bei der Detergensbehandlung sollten besonders folgende Parameter beachtet werden: neben der Art des Detergens spielen seine Konzentration, die Temperatur, Dauer und Art (z.B. Rühreffekt) der Inkubation eine wesentliche Rolle. Alle diese Parameter müssen deshalb einzeln untersucht werden.

Es wurden ionische und nichtionische Detergentien untersucht, die als membranlösende Substanzen bekannt sind, Natriumdesoxycholat (NaDOC), Brij 58 und Triton X 100. Ein Vergleich dieser Agenzien untereinander bei ihrer jeweils optimalen Konzentration zeigt, daß keine großen Unterschiede im Ablösungseffekt vorhanden sind (Tab. 1). In den meisten Versuchen zeigt sich NaDOC etwas wirksamer als Brij und Triton. NaDOC hat jedoch den großen Nachteil, daß es bei einer Konzentration > 0,5 % in Suspensionen oder Lösungen mit hoher Salzkonzentration - wie sie hier bei der Präparation der Ribosomen vorliegen - die Suspension zu einer zähflüssigen Masse, z.T. zu einer Gallerte, erstarren läßt. Nur in verdünnten Lösungen bzw. in aqua dest. ist NaDOC auch in höheren Konzentrationen gut löslich. Der Effekt der Gallertebildung behindert das Abzentrifugieren der freien Ribosomen im Gradienten sehr stark, so daß verfälschte Verteilungswerte zustande kommen. Weitere Untersuchungen [z.B. 24] zeigten, daß NaDOC Ribosomen angreift und RNS-haltiges Material ablöst.

Deshalb wurde - wenn nicht anders angegeben - mit 1 % Triton X 100 gearbeitet. Höhere Tritonkonzentrationen verstärken den Ablösungseffekt nicht, Verringerung unter 0,5% bewirkt eine Verminderung der Ablösungseffektivität.

Ein Zusatz von 0,3 % NaDOC zu 1 % Triton verbesserte die Effektivität der Detergentien nicht. Die Temperatur bei der Detergensbehandlung hat wider Erwarten zwischen 4°C und 30°C keinen wesentlichen Einfluß

auf die Effektivität des Agens. Diese Versuche wurden sowohl mit 0,3 % NaDOC als auch mit 1 % Triton X 100 durchgeführt.

In der Regel ist eine Inkubationszeit von 30 min. ausreichend. Gelegentlich kann noch eine geringe Steigerung der Ribosomenablösung bei Behandlung bis zu 60 Minuten erzielt werden.
Die Behandlung wurde unter [illegible] sichtigem Rühren mit einem Magnetrührer durchgeführt.
Die Behandlung von rauhen Membranen bei 4°C in Tris-Puffer ohne Detergens führte im Gegensatz zu Ergebnissen anderer Autoren [12] nicht zu einer Ablösung der Ribosomen.

Tab. 1: Ablösung radioaktiver, Uracil-2-^{14}C-markierter Ribosomen durch Behandlung des Membranniederschlages mit verschiedenen Detergentien

Agens	abgelöste Radioaktivität bezogen auf die Gesamtradioaktivität [%]
1 % Triton X 100	60-65
1 % Brij	60-70
0,5 % NaDOC	85-90
50 µg/ml RNase	85-90
50 µg/ml Lipase	80-85
Tris-Puffer	0-5

Da unter vergleichbaren Bedingungen jeweils etwa die gleiche Menge an Ribosomen abgelöst wird, wirkt sich die nicht vollständige Ablösung der Ribosomen durch Triton nicht sehr fehlerhaft aus, sondern hat nur eine geringe Verschiebung der quantitativen Resultate zur Folge.

Der Anteil an membrangebundenen Ribosomen, der hier angetroffen wird, dürfte daher etwas zu gering sein.

Die Wirksamkeit der Agenzien und der Test auf die optimale Ablösung der Ribosomen von den Membranen wurde mit Uracil-2-^{14}C markierten Zellen durchgeführt. Es zeigte sich auch hier, daß NaDOC eine etwas größere Wirksamkeit als Triton und Brij besitzt. Jedoch konnte selbst mit RNase oder mit Lipase keine 100%ige Ablösung der Radioaktivität von der Mikrosomenfraktion erreicht werden (s. Tab. 2). Dies läßt sich damit erklären, daß in dieser Fraktion auch unzerstörte Mitochondrien mit mitochondrialen Ribosomen vorhanden sind; allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß der Mitochondrien-Anteil unter den vorliegenden Zuchtbedingungen nicht sehr hoch ist. Weiterhin ist es möglich [22], daß RNS-Partikel durch das Lumen des endoplasmatischen Retikulums geschleust werden. Auch diese markierten RNS-Partikel sind durch RNase-Behandlung nicht aus der Membranfraktion zu entfernen.

Es ist also anzunehmen, daß mit NaDOC bzw. RNase die Ribosomenablösung vollständig, mit Brij und Triton etwas geringer ist.

3.1.4 Test der quantitativen Sedimentation im Stufengradienten

Mit diesem Versuch wird getestet, bei welcher Zentrifugationsdauer des Sukrosegradienten eine maximale Sedimentierung der Ribosomen erreicht werden kann, und zwar sowohl nach Braun- als auch nach French-Press Homogenisation.

Abb. 3 zeigt die sedimentierte Ribosomenmenge in Abhängigkeit von der Zentrifugationsdauer. Nach etwa 22 Stunden wird ein Plateau erreicht, bei dem der Kurvenverlauf der verschiedenen Fraktionen etwa

parallel ist. Daraus läßt sich schließen, daß nach spätestens 24 Stunden sämtliche sedimentierbaren Ribosomen in den Niederschlägen erfaßt sind, wobei kein Unterschied zwischen den Homogenisationsarten festzustellen ist. Die ehemals an grobe Membranpartikel gebundenen Ribosomen (RF_1) sedimentieren schneller als die beiden anderen Ribosomenfraktionen (RF_2 und RF_3); es bleibt nachzuprüfen, ob in der RF_1 Fraktion mehr Polysomen vorliegen als in den anderen.

Zur weiteren Kontrolle der vollständigen Sedimentation wurden 48 Stunden mit Uracil-2-^{14}C markierte Zellen verwendet und die Radioaktivität nach der Gradientenzentrifugation in der mit Triton behandelten Fraktion in Überstand und Niederschlag gemessen. Die im Überstand verbliebene Radioaktivität beträgt etwa 6 % der Gesamtaktivität. Das entspricht der im Überstand zu erwartenden tRNS-Menge, so daß angenommen werden kann, daß die freien Ribosomen und die durch Triton freigesetzten ehemals gebundenen Ribosomen vollständig sedimentiert sind.

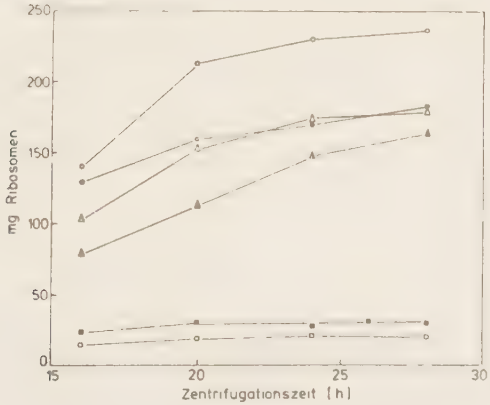

Abb. 3: Die im Stufengradienten sedimentierte Ribosomenmenge der einzelnen Ribosomenfraktionen in Abhängigkeit von der Zentrifugationsdauer. Vergleich zwischen der Homogenisation in der French-Press (gefüllte Symbole) und im Braun-Homogenisator (offene Symbole).

- ■ ○ ehemals membrangebundene Ribosomen = RF_1
- ▲ △ freie Ribosomen = RF_3
- ● ○ ehemals membrangebundene und freie Ribosomen = RF_2

(genauere Erklärung für RF_1, RF_2 und RF_3 s. Abb. 4)

3.1.5 Isolierungsschema

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Ribosomenfraktionen nach dem folgenden Schema (Abb. 4) isoliert:
Je nach dem Ziel der geplanten Untersuchung wurden einzelne Präparationsschritte variiert.

Obwohl die Detergensbehandlung noch nicht optimal gelöst wurde, hat sich das in Abb. 4 beschriebene Schema zur Isolierung membrangebundener und freier Ribosomen bewährt.

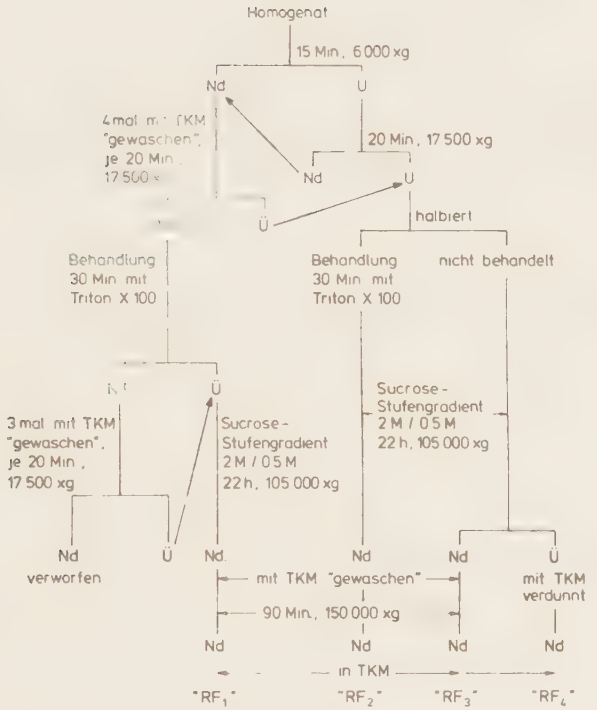

Abb. 4: Isolierungsschema zur Präparation freier und membrangebundener Ribosomen aus Hefezellen (Einzelheiten s. Material und Methoden sowie Kapitel 3.1). Nd. = Niederschlag, Ü = Überstand, TKM = Trispuffer, s. Material und Methoden, "RF_1" = durch Triton X 100 abgelöste, ehemals an "grobe" Membranpartikel gebundene Ribosomen, "RF_2" = durch Triton X 100 abgelöste, ehemals an "kleine" Membranpartikel gebundene Ribosomen und freie Ribosomen, "RF_3" = freie Ribosomen, "RF_4" = "rauhe" Mikrosomenfraktion, membrangebundene Ribosomen.

3.2 Charakterisierung membrangebundener und freier Ribosomen

Die nach dem oben beschriebenen Schema isolierten Ribosomenfraktionen wurden sowohl auf ihre biologische Aktivität in einem zellfreien poly-U-abhängigen Proteinbiosynthese-System als auch auf ihr physikalisches Verhalten im linearen Dichtegradienten untersucht. Zu den Untersuchungen im Dichtegradienten wurden die Fraktionen unter den bei der Isolierung verwendeten Salzkonzentrationen und nach Einwirkung steigender KCl-Konzentrationen im Sukrose-Gradienten getestet.

Untersucht wurden die ehemals membrangebundenen, durch Detergens freigesetzten Ribosomen (RF_1), die freien (RF_3) und die noch membrangebundenen Ribosomen (RF_4). Die RF_2-Fraktion, die eine Mischfraktion darstellt, wurde nicht näher untersucht.

3.2.1 Proteinbiosynthese in vitro

Die Fraktionen RF_1, RF_3 und RF_4 wurden im poly-U-abhängigen Polypeptid-synthetisierenden zellfreien System getestet. Tab. 2 zeigt die Mittelwerte der Ergebnisse mit Ribosomenfraktionen aus drei Isolierungen.

Obwohl es deutliche quantitative Unterschiede zwischen den Fraktionen der verschiedenen Isolierungen gibt, stimmen die Ergebnisse qualitativ überein. Die drei Ribosomenfraktionen unterscheiden sich in ihrer Polypeptid-synthetisierenden Aktivität im zellfreien System: die freien Ribosomen (RF_3) sind deutlich aktiver als die membrangebundenen (RF_4) und die mit Detergens behandelten Fraktionen (RF_1).
Nach neueren Untersuchungen könnte die geringere Aktivität der RF_1-Ribosomen darauf zurückzuführen sein, daß Triton X 100 Ribosomen

durch Ablösung von proteinhaltigem Material schädigt [24] und damit auch ihre biologische Aktivität einschränkt.

Die wesentlich geringere Aktvität der Ribosomen-Fraktionen aus Isolierung II ist dadurch erklärbar, daß sich die hierbei verwendete Zellkultur bei der Isolierung am Ende der logarithmischen Wachstumsphase (log-Phase) befand, während die beiden anderen Isolierungen in der zweiten Hälfte der log-Phase durchgeführt wurden. In dieser Phase des Wachstums besitzen die Ribosomen bzw. Polysomen ihre höchste biologische Aktivität [43, 52].

Die Abhängigkeit von den essentiellen Komponenten des Systems und die Hemmbarkeit durch Proteinsynthese-Inhibitoren unterscheiden sich bei den drei isolierten Fraktionen nicht wesentlich. Eine Ausnahme bildet die Abhängigkeit von den "Überstandsenzymen", die bei RF_3 sehr gering, bei den anderen Fraktionen stärker ist. Möglicherweise ist in der RF_3 -Fraktion nach der Isolierung noch ein Teil der notwendigen Faktoren am Ribosom gebunden, so daß die Zugabe von Enzymen keine wesentliche Steigerung der Proteinsyntheserate mehr bewirkt.

Tab. 2: Polypeptidsynthese mit den Fraktionen RF_1, RF_3 und RF_4 in einem poly-U-abhängigen zellfreien System.
Durchführung siehe Material und Methoden.
Die Ergebnisse von Versuch II und III sind Mittelwerte (M) aus je 3 Versuchen mit den Fraktionen einer Isolierung. Die Isolierungen von Versuch I und II stammen aus Kulturen aus der 2. Hälfte der log-Phase, die von Versuch II aus dem Ende der log-Phase.

	Ribosomenfraktion											
	RF_1				RF_3				RF_4			
Isolierung	I	II	III	M	I	II	III	M	I	II	III	M
Einbau ^{14}C- Phenylalanin [pMol/mg Ribosomenprotein]	222	23	178	141	829	131	523	494	705	15	96	272
Einbau [%] Gesamtsystem	=100	=100	=100	=100	=100	=100	=100	=100	=100	=100	=100	=100
- Ribosomen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
- Enzymfraktion	38	28	28	31	-	-	82	82	58	37	28	41
- poly-U	18	28	11	19	18	6	8	11	13	6	2	7
- Energie [ATP, GTP, PEP]	8	11	0	6	1	1	0	1	2	1	0	1
- tRNA	-	-	7	7	-	-	3	3	-	-	6	6
+ Puromycin 0,01 M	27	0	26	18	25	27	40	31	26	0	8	11
+ Cycloheximid 0,01 M	-	26	22	24	15	6	22	14	17	9	21	16

Sedimentationsanalyse der Ribosomenfraktionen

Abb. 5 zeigt die typischen Profile der Fraktionen RF_1, RF_3 und RF_4. Die mit Detergens behandelte RF_1-Fraktion unterscheidet sich von den freien Ribosomen (RF_3) nur durch einen stärkeren Abbau der Polysomen zu freien Ribosomen. Die Polysomenfraktionen der hier gezeigten Profile wurden nach der French-Press-Homogenisation isoliert. Die Homogenisation mit dem Braun-Homogenisator ergab Fraktionen, in denen der Polysomenanteil zugunsten der freien Ribosomen abnahm. Eine Ablösung von den Membranen durch Homogenisation mit dem Braun-Homogenisator konnte in diesem Test nicht nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den oben beschriebenen Ergebnissen überein.

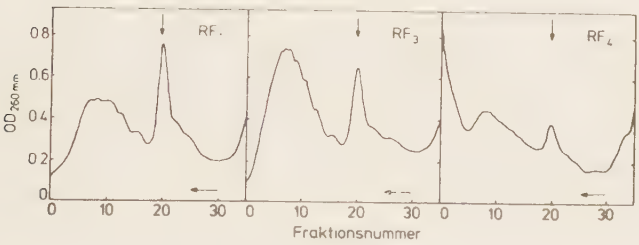

Abb. 5: Polysomenprofile der Fraktionen RF_1 (ehemals membrangebundene Ribosomen, abgelöst mit 1 % Triton X 100), RF_3 (freie Ribosomen) und RF_4 (membrangebundene Ribosomen). Zentrifugation im linearen Sukrosegradienten (10-50%, w/v) im SW 27 Rotor bei 27 000 upm, 4.5 h (0°C).

3.2.3 Sedimentationsanalyse der 80 S-Ribos[illegible] Konzentration

Die Behandlung mit steigenden Konzentrationen von KCl (> 0,05 M) bewirkt eine Dissoziation der Monosomen in 60 S-und 40 S-Untereinheiten. Solche Ergebnisse sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden [z.B.40]. Da zwischen den einzelnen Fraktionen kein deutlich unterschiedliches Verhalten nachgewiesen werden konnte, wird hier als Beispiel nur das Profil der freien Ribosomen (RF_3-Fraktion) bei Konzentrationen von 0,05 M bis 1,0 M KCl gezeigt (Abb. 6). Die 80 S - Monomere (Abb. 6a) sind bei 0,5 M KCl (Abb. 6c) vollständig in ihre [illegible] S-und 40 S-Untereinheiten dissoziiert und zeigen damit ein Verhalten wie es auch in der Literatur beschrieben wurde [z.B. 40].

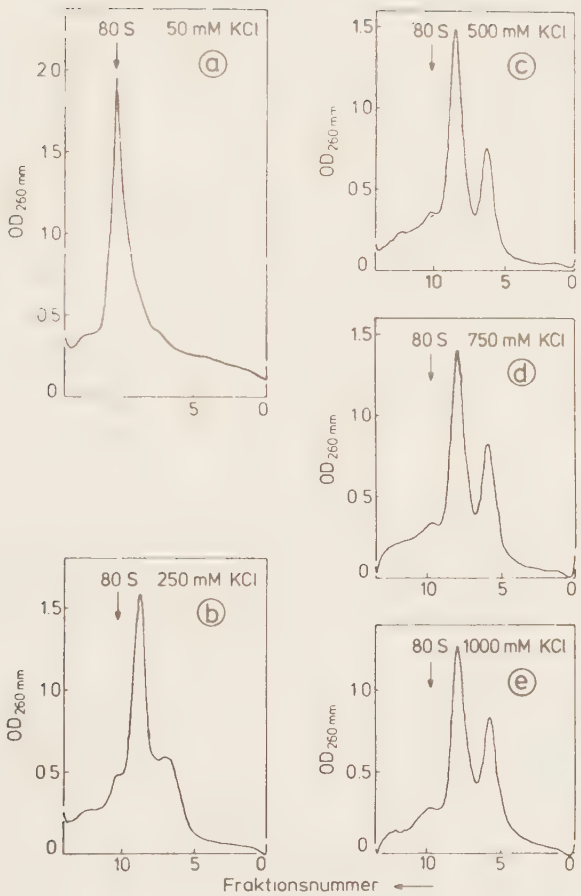

Abb. 6: Die Dissoziation von 80 S-Ribosomen bei steigender KCl-Konzentration. Sedimentation im linearen Sukrosegradienten (10-50%, w/v) im SW 41 Rotor, 15 h bei 18 000 upm (14 °C).

3.3 Untersuchungen zur Funktion von membrangebundenen und freien Ribosomen in synchron wachsenden Hefezellen

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß die Funktion der freien und membrangebundenen Ribosomen noch umstritten ist. Zwei Hauptthesen stehen sich gegenüber:

a] freie und gebundene Ribosomen synthetisieren spezifisch jeweils verschiedene Proteine;

b] die beiden Ribosomenarten stellen verschiedene Stufen im Ribosomenzyklus dar, und die Proteinsynthese erfolgt nur an einer Ribosomenart. Es liegen unterschiedliche Auffassungen darüber vor, ob an den freien [4] oder an den gebundenen Ribosomen [29] Proteine synthetisiert werden.

In diesem Kapitel wird zunächst untersucht, welchen Anteil am Gesamtribosomengehalt der Zelle die freien bzw. membrangebundenen Ribosomen haben. Dann wird untersucht, ob dieser Anteil während des Wachstums einer Zellkultur konstant bleibt oder sich während eines Zellzyklus verändert.
Parallel zur Messung des Gehaltes an freien und membrangebundenen Ribosomen während des Wachstums der Zellen werden Protein- und RNS-Synthese verfolgt. Dabei interessiert besonders, ob sich Schwankungen dieser Syntheseleistungen entsprechenden Schwankungen im Ribosomengehalt bzw. zu bestimmten Phasen des Zellzyklus zuordnen lassen. Aus den Ergebnissen werden Schlüsse sowohl über einen möglichen turn-over als auch den Ort der Proteinbiosynthese gezogen.

Abschließend wird auf der Grundlage dieser Ergebnisse ein turn-over-Modell entwickelt.

Synchronisation

Synchronisierte Zellkulturen sind eine wesentliche Voraussetzung zur Durchführung der oben genannten Experimente. Deshalb wird zunächst auf Probleme der Synchronisation eingegangen und später diskutiert wie Anfang und Ende einzelner Zellzyklen festgestellt werden können.

Methoden zur Synchronisation von Hefekulturen sind in der Literatur vielfach beschrieben worden (zur Übersicht s. [31]). Die meisten Synchronisationsmethoden beruhen auf chemischer oder physikalischer Behandlung der Zellen. Bei den vorliegenden Experimenten sollten schockartige Veränderungen vermieden werden, um den Zellstoffwechsel nicht zu beeinträchtigen. Daher standen im wesentlichen nur zwei Synchronisationsmethoden zur Auswahl:

a] Mit Hilfe der Zonalzentrifugation wird versucht, die Zellen nach ihrer Größe zu trennen [9, 48] bzw. aus stationären Zellkulturen gleichgroße Zellen ohne Knospen zu isolieren, die dann als Ausgangszellen für Kulturen verwendet werden. Mikroskopische Untersuchungen von Kraft [24] zeigten, daß diese Methode keine scharfe Trennung unterschiedlicher Zellgrößen ergibt. Außerdem konnten durch Zonalzentrifugation auch aus einer großen Zellmenge nur so kleine Fraktionen herausgeschnitten werden, daß der Anfangszelltiter für die Isolierungen nicht genügend hoch einzustellen war. Ein hoher Anfangstiter ist jedoch notwendig, da auch unter optimalen Bedingungen ein paralleles Wachstum der Zellen nur während der ersten Verdopplungsperioden erreicht werden kann [5, 11, 14], so daß bereits in den ersten beiden Verdopplungsphasen genügend Zellmaterial zur Isolierung gewonnen werden muß.

b] Als Vorkultur werden "alte" Zellen aus der spätstationären Wachstumsphase (48 Stunden) verwendet und die Kulturen mit einem hohen Anfangstiter ($5,8 \cdot 10^6$ Zellen pro ml Kultur) ge-

startet. In der Regel ist der Synchronisationsgrad bei Anwendung dieser Methode während der ersten beiden Zellzyklen hinreichend gut. Mikroskopische Untersuchungen zeigten auch im Vergleich zu der oben beschriebenen wesentlich aufwendigeren Methode keine schlechteren Ergebnisse. Außerdem läßt sich der erforderliche hohe Zelltiter problemlos einstellen. Aus diesen Gründen wird das zuletzt genannte Verfahren angewendet.

3.3.2 Die Messung der Verdopplungsperioden in synchron wachsenden Hefekulturen

3.3.2.1 Zellzahl, Zelltrockenmasse und optische Dichte

Welches Maß man für Beginn und Ende der einzelnen Phasen des Zellzyklus benutzt, hängt u.a. von der Synchronisationsmethode ab. Generell können die Zunahme der makromolekularen Trockenmasse, des Zellvolumens, der totalen Trockenmasse oder die Synthese von Makromolekülen (z.B. Protein) Aussagen zur Bestimmung einzelner Zellzyklusphasen liefern [31].

Auch die Zellzahl kann als Maß für den Zellzyklus benutzt werden. Sie sollte bei optimal synchronisierten Zellen in den ersten Zyklen stufenförmig ansteigen [31].

Die Zellzahl kann entweder durch Auszählen in einer Hämacytometerkammer oder indirekt durch die Messung der optischen Dichte (OD) mit Hilfe einer Eichkurve für das Verhältnis zwischen OD und Zellzahl ermittelt werden (Abb. 7). Dazu wird eine Verdünnungsreihe einer Zellsuspension aus der stationären Phase hergestellt, die Zellen jeweils ausgezählt und die optische Dichte gemessen.

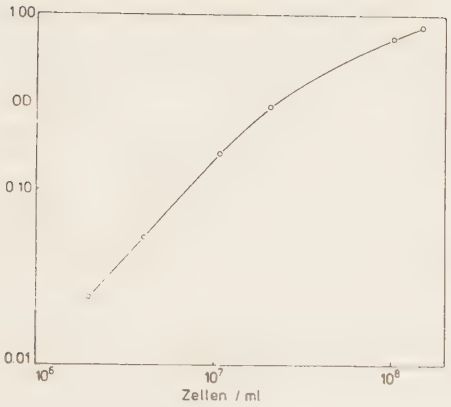

Abb. 7: Die optische Dichte (OD) einer Hefekultur (St. 2200) in Abhängigkeit von der Zellzahl/ml Kultur.

Beide Methoden haben sich als problematisch erwiesen: die erstere ist sehr aufwendig und bezüglich der Zellzahl nicht eindeutig durch das Vorhandensein knospender Zellen; die Zweite geht von Zellen gleicher Größe und daher einer mittleren Zellzahl aus und ist deswegen fehlerhaft. Aus diesen Gründen wird als Maß für die Verdopplungsperiode einer Zellkultur die Zelltrockenmasse benutzt. Sie steigt bei Saccharomyces cerevisiae während eines Zellzyklus linear an [32, 45] und kann daher als Maß für die Zellzyklusphase verwendet werden.

Das Wachstum der Kulturen kann am einfachsten durch die Messung der optischen Dichte in regelmäßigen Zeitabständen verfolgt werden. Deswegen wurde die Trockenmasse pro ml Kultur in Abhängigkeit von der OD bestimmt (Entnahme von je 20 ml Kultur bei verschiedenen optischen Dichten, nach mehrfachen Waschen in dest. Wasser 48stündige Lyophilisierung und Bestimmung des Trockengewichtes).

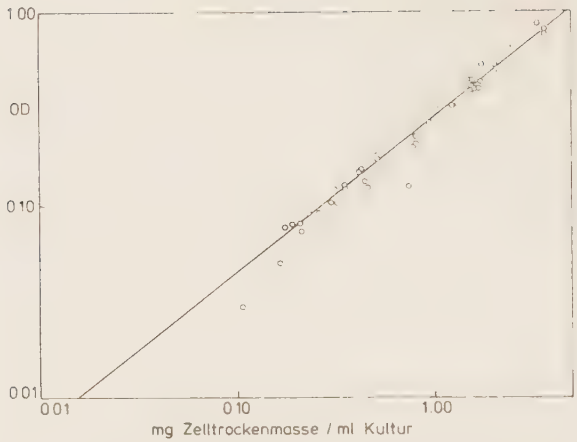

Abb. 8: Die optische Dichte (OD) einer Hefekultur (St. 2200) in Abhängigkeit von der Zelltrockenmasse/ml Kultur.

Abb. 8 zeigt die aus den erhaltenen Meßwerten graphisch ermittelte Eichkurve. Bei doppelt logarithmischer Auftragung besteht demnach ein linearer Zusammenhang zwischen der Zelltrockenmasse pro ml Kultur und der OD.

Für die Berechnung der Zellmasse m (definiert als mg Trockenmasse pro ml Kultur) aus der OD ergibt sich nach Ablesen der Steigungskonstanten

$$\log m = \frac{\log OD + 0,55}{0,8} \qquad (1)$$

3.1.2 Die Verdopplungszahl

Abb. 9a zeigt die übliche Darstellung der Wachstumskurve einer Zellkultur in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

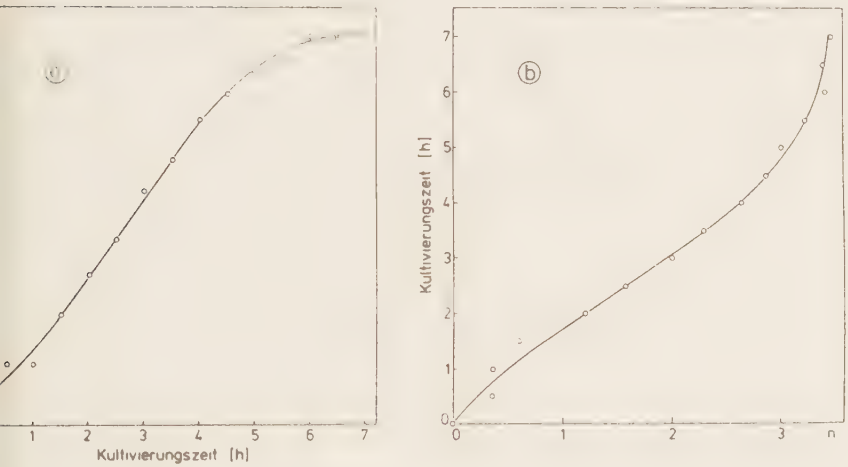

Abb. 9: Die Wachstumskurve einer Hefekultur:
[a] die optische Dichte (OD) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.
[b] Die Kultivierungszeit in Abhängigkeit von der Verdopplungszahl n

$$n = \frac{\log \frac{OD}{OD_o}}{0.8 \log 2}$$

Ableitung siehe S. 36

Die Verdopplung der Zellmasse, die als Maß für Anfang und Ende eines Zellzyklus dienen soll, ist bei dieser Darstellungsweise nicht linear. Deswegen lassen sich Wachstumsphasen verschiedener Zyklen einander nicht eindeutig zuordnen. Dies ist für die folgenden Experimente jedoch eine Voraussetzung, da verschiedene Syntheseleistungen der Zelle während des Wachstums gemessen, miteinander verglichen und den einzelnen Perioden des Zellzyklus zugeordnet werden sollen. Deswegen erscheint es sinnvoll, das Wachstum einer Zellkultur in linearer Abhängigkeit von der Anzahl der Zellmassenverdopplungen (Verdopplungszahl n) aufzutragen. Der Zusammenhang zwischen der Verdopplungszahl n und der Zunahme der Zellmasse m (m_o = Ausgangszellmasse) ist in Abb. 10 graphisch dargestellt;

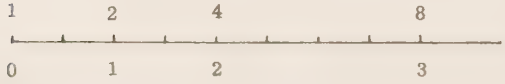

Abb. 10

Es besteht also die folgende Beziehung:

$$m = 2^n \cdot m_o \quad . \qquad (2)$$

Nach Logarithmieren läßt sich diese Beziehung nach n auflösen:

$$n = \frac{\log \frac{m}{m_o}}{\log 2} \qquad (3)$$

Setzt man für log m Gleichung (1) ein, erhält man

$$n = \frac{\log \frac{OD}{OD_o}}{0,8 \quad \log 2} \quad ; \qquad (4)$$

OD_o ist die Ausgangs-OD.

Mit Hilfe von Gleichung (4) läßt sich die Verdopplungszahl direkt aus der entsprechenden OD berechnen. Sie kann damit leicht anstelle von log OD als Maß für das Wachstum einer Kultur verwendet werden. So können Stoffwechselleistungen sowohl einer als auch verschiedener Kulturen in Abhängigkeit der Zellzyklusphase parallel betrachtet werden. Dazu wird die Verdopplungszahl auf der Abszisse aufgetragen (Abb. 9b). Generell ist diese Betrachtungsweise sinnvoll, da im Gegensatz zur Kultivierungszeit die Verdopplungszahl direkt und unabhängig von der Wachstumsphase den Zustand im Zellzyklus angibt.

Bei diesen Betrachtungen ist vorausgesetzt, daß das Wachstum jeder Kultur bei der gleichen Zyklusphase startet, daß gleiche Verdopplungszahlen gleichen Phasen im Zellzyklus entsprechen. Dies wird mit Hilfe der oben beschriebenen Synchronisationsmethode (s. Kapitel 3.3.1) annähernd erreicht. Das zeigen z.B. auch die Experimente zur Proteinbiosynthese in vivo (Abb. 11a-d) : die Maxima der Proteinsyntheserate liegen in der Regel bei den gleichen Verdopplungszahlen der verwendeten Kulturen. Wenn trotzdem geringe Phasenverschiebungen zwischen n = 0 und n = 1 auftreten, werden sie bei der Messung der Proteinbiosyntheserate sichtbar (s. Kapitel 3.3.3, Abb. 11 d) und können somit in dem hier erforderlichen Rahmen kontrolliert werden.

Für die Bestimmung der konkreten Zyklusphasen (G_1, S, etc.) müßten zusätzlich entsprechende Analysen wie z.B. Bestimmung der DNS-Synthese durchgeführt werden. Dies ist allerdings für die vorgesehenen Versuche nicht erforderlich, da die verglichenen Versuche ohne nähere Spezifizierung einander zugeordnet werden.

cpm · 10²/ mg Zelltrockengew
Kultivierungszeit [min]
n
a
b
c
d

Abb. 11: Vergleich der Proteinsyntheseraten (Aufnahme von ^{14}C-Aminosäuregemisch) während der ersten beiden Zellzyklen verschiedener synchronisierter Hefekulturen in Abhängigkeit von der Verdopplungszahl n .
(a - c): gut synchronisierte Zellkulturen.
(d): Beispiel für eine weniger gute Synchronisation.
1] Die Kultivierungszeit ist hier vom ersten Meßpunkt an aufgetragen. —●— Wachstumskurven.

.3 Proteinbiosynthese während eines Zellzyklus

Die Messung der Proteinbiosyntheserate erfolgte nach Pulsmarkierungen von jeweils 7 Minuten mit ^{14}C Aminosäuregemisch und nachfolgender Filtration der Zellen aus dem Inkubationsmedium und Messung der aufgenommenen Radioaktivität der Zellen. Nach Takamori et al. [50] kann bei den verwendeten Hefezellen die Aminosäure-Aufnahme qualitativ mit der Proteinbiosyntheserate gleichgesetzt werden.
Bei der Messung d . Proteinsyntheserate während des Wachstums von Hefekulturen interessierten besonders die beiden folgenden Fragen:

[1] Gibt es reproduzierbare Schwankungen der Proteinsyntheserate während des Wachstums einer Kultur und können daraus Schlüsse über den Synchronisationsgrad gezogen werden ?

[2] Erscheinen Schwankungen der Proteinsyntheserate bei den Kulturen an den gleichen Verdopplungszahlen, so daß angenommen werden kann, daß gleiche Verdopplungszahlen gleiche Phasen im Zellzyklus bedeuten ?

Zu [1] : In nicht synchronisierten Hefekulturen wurden ein bis zwei Maxima der Proteinsyntheserate über der gesamten Wachstumskurve gefunden [30]. Für synchronisierte Kulturen nehmen einige Autoren einen linearen Anstieg des Gesamtproteins während eines Zellzyklus an [15, 54]. Andererseits werden viele Enzyme periodisch in einem Zellzyklus synthetisiert [z.B. 13], so daß auch eine periodische Schwankung der Gesamtproteinsyntheserate erwartet werden kann.
Die typischen Versuchsergebnisse der vorliegenden Arbeit zu dieser Frage sind in Abb. 11 zusammengefaßt. Danach kann folgendes festgestellt werden:

a] Die Gesamtproteinsynthese während des Wachstums einer Kultur erfolgt in periodischen Schwankungen.

b] Obwohl die Schwankungen unterschiedlich stark ausgeprägt sind, sind zwei Maxima der Proteinsyntheserate pro Verdopplungsperiode zu erkennen (Abb. 11a-c). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß bei differenzierterer Messung noch weitere Schwankungen gefunden werden können. Dafür spricht auch, daß die Aktivität zahlreicher (über dreißig verschiedener) Proteine an bestimmten Punkten im Zellzyklus stufenweise ansteigt [16].

c] Die Reproduzierbarkeit der Schwankungen spricht für eine ausreichend gute Synchronisation der verwendeten Kulturen. Die unterschiedlich starke Ausprägung der Schwankungen sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf einen unterschiedlich guten Synchronisationsgrad zurückzuführen. Ein Beispiel für eine weniger gut synchronisierte Kultur mit nur einem Synthesemaximum pro Zellzyklus ist in Abb. 11d gezeigt.

d] Eine gute Synchronisation ist in der Regel während der ersten beiden Verdopplungsperioden zu beobachten. Spätestens nach der dritten Verdopplung der Zellmasse läßt der Synchronisationsgrad erwartungsgemäß stark nach. In Abb. 11 c, die ein Beispiel für eine gute Anfangssynchronisation zeigt, ist das Nachlassen der Synchronisation an der Verringerung der Schwankungsamplitude sowie der Verbreiterung der Maxima zu erkennen. Deshalb sind die nachfolgenden Experimente während der ersten beiden Zellzyklen durchgeführt worden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Messung der Proteinsyntheserate während des Wachstums einer Hefekultur eine Beurteilung ihres Synchronisationsgrades ermöglicht.

Zu [2]: Mit Ausnahme von Abb. 1d liegen die Maxima der Proteinsynthese bei den gleichen Verdopplungszahlen, nämlich bei etwa $n \sim 0,5$, $n \sim 1,0$, $n \sim 1,5$ ..... . Daraus kann geschlossen werden, daß die Verdopplungszahlen dieser Kulturen jeweils etwa die gleichen Zellzyklusphasen bedeuten. Leichte Verschiebungen der Maxima sind durch leichte Verschiebungen der Startphase zu erklären, die unter den angewendeten Bedingungen nicht ganz auszuschliessen sind.

Geringfügige Verzögerungen der Proteinsyntheserate während der ersten Verdopplungsperiode sind darauf zurückzuführen, daß sich die Zellkulturen während dieser Periode noch in bzw. am Ende der " lag " - Phase befinden. Zu dieser Zeit ist der Zellstoffwechsel noch nicht vollständig angelaufen. Daraus ergibt sich auch eine Verlängerung der ersten Verdopplungsperiode um ca. 20 Minuten. Die Dauer der " lag"-Phase ist bei den verwendeten Kulturen unter den angegebenen Bedingungen etwa gleich (90 - 100 Minuten).

Der starke Abfall der Proteinsyntheserate in Abb. 11a ist durch den Beginn der stationären Phase der Kultur bedingt. Diese Kultur erreicht die stationäre Phase wegen des besonders hohen Anfangszelltiters ($2 \cdot 10^7$ Zellen/ml; OD = 0,265) schon am Ende der zweiten Verdopplungsperiode.

Abschließend kann festgestellt werden:

1. Die Schwankungen der Proteinsyntheserate geben Auskunft über die Güte der Synchronisation einer Kultur.
2. Gleiche Verdopplungszahlen verschiedener Kulturen bedeuten gleiche Phasen im Zellzyklus und ermöglichen daher den Vergleich verschiedener Stoffwechselleistungen einer Kultur bzw. mehrerer Kulturen untereinander.

3.3.4 RNS-Synthese während eines Zellzyklus

Die Aufnahme von Uracil-2-^{14}C wurde nach Pulsmarkierungen von je 7 Minuten während der ersten beiden Verdopplungsperioden gemessen. Allgemein kann die Uracil-Aufnahme qualitativ als Maß für den Einbau von Uracil in Nukleinsäurefraktionen und damit für die RNS-Synthese gelten [50].

In Abb. 12a und b ist die Uracil-2-^{14}C-Aufnahme in Abhängigkeit von der Verdopplungszahl n aufgetragen. Der unterschiedliche Verlauf der Aufnahmerate läßt auf eine gute (Abb. 12a) bzw. weniger gute (Abb. 12b) Synchronisation der verwendeten Zellkulturen schliessen.

Pro Zellzyklus ist in Abb. 12a je ein Maximum des Einbaues zu erkennen, wobei das Maximum des ersten Zellzyklus wesentlich niedriger ist als das des Zweiten; das läßt sich einerseits dadurch erklären, daß während der lag-Phase die Nukleotid- bzw. Ribosomenpools noch so groß sind, daß nur eine geringe Uracil-Aufnahme nötig ist. Andererseits sind möglicherweise auch noch nicht so viele Transportproteine für Uracil synthetisiert wie in den darauffolgenden Zyklen. Im Unterschied dazu erfolgt die Aminosäureaufnahme (s. o.) sofort in hoher Rate, d.h., der Aminosäurepool ist in der spät-stationären Wachstumsphase verbraucht.

Das Fehlen eines dritten Maximums bei $n \sim 2,5$ ist einerseits zurückzuführen auf die mit steigender Verdopplungszahl schlechter werdende Synchronisation und andererseits darauf, daß bei Beginn der stationären Wachstumsphase keine nennenswerte Neusynthese von RNS mehr stattfindet.

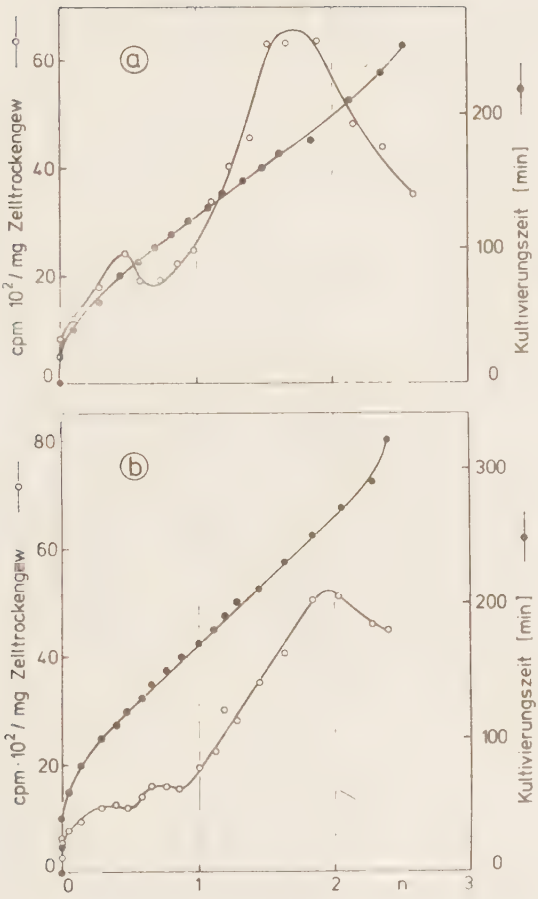

Abb. 12: Uracil-2-^{14}C-Einbau während des Wachstums einer gut (a) und einer nicht gut (b) synchronisierten Hefekultur in Abhängigkeit von der Verdopplungszahl n .

—●— Wachstumskurven.

3.3.5 Die Verteilung von membrangebundenen und freien Ribosomen während eines Zellzyklus

In Hefezellen verschiedener Wachstumsphasen wurde der prozentuale Anteil an freien und membrangebundenen Ribosomen bestimmt.
In Zellen der stationären Phase wird eine Verteilung von etwa 73 % der freien zu 27 % membrangebundenen Ribosomen gemessen. Während des logarithmischen Wachstums zeigt sich eine periodische Schwankung der prozentualen Verteilung (Abb. 13). Der Gesamtribosomengehalt bleibt über der gesamten Wachstumskurve im wesentlichen konstant und nimmt erst in der späten stationären Phase entsprechend dem physiologischen Zustand der Zellen stark ab.
Die Zuordnung der periodischen Schwankungen zu einzelnen Zellzyklen der Kultur wurde früher mit Hilfe der Zellzahl versucht ([42], Abb. 13a). Eine genauere Zuordnung ist mit Hilfe der Verdopplungszahl (s. 3.3.2) möglich und ergibt für jeden Zellzyklus mindestens ein Maximum des prozentualen Anteils an membrangebundenen Ribosomen (Abb. 13b). Differenziertere Beobachtungen zeigen, daß die Existenz eines zweiten Maximums nicht ausgeschlossen werden kann (s.u., Abb. 14).

3.3.6 Die Ribosomenverteilung in Stämmen verschiedenen Ploidiegrades

Die oben beschriebenen Messungen der Ribosomenverteilung wurden auch an Hefestämmen verschiedenen Ploidiegrades durchgeführt, nämlich dem haploiden Stamm 1000 und dem diploiden Stamm 211 [25]. Diese Stämme, einschließlich dem Stamm 2200, sind weitgehend isogen und homozygot untereinander.

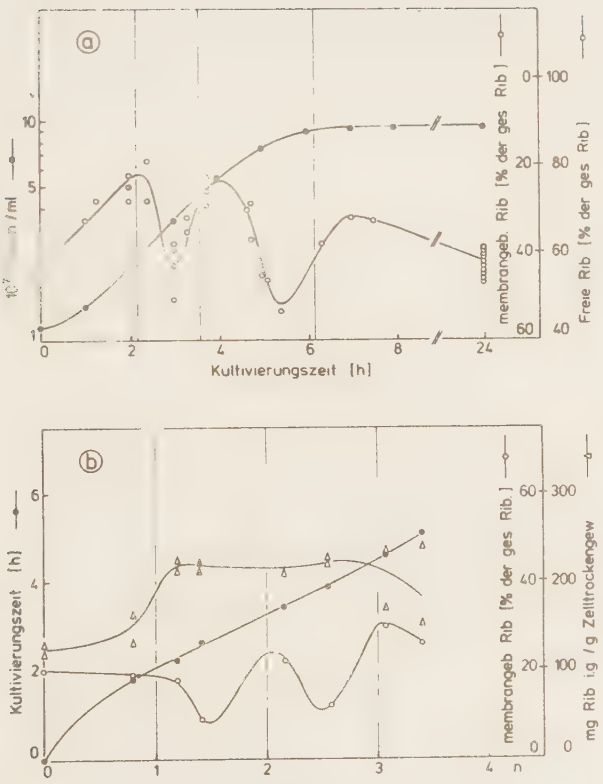

Abb. 13: Die prozentuale Verteilung membrangebundener Ribosomen zu verschiedenen Phasen des Wachstums,
(a) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit,
(b) in Abhängigkeit von der Verdopplungszahl n .

—△— der absolute Gehalt an Gesamt-Ribosomen (mg Rib. i. g.)

—●— Wachstumskurve

—○— der prozentuale Anteil an membrangebundenen Ribosomen

Die Messungen ergeben ebenfalls periodische Schwankungen des prozentualen Anteils der beiden Ribosomenarten während des logarithmischen Wachstums. Auch die Verteilung in der stationären Phase unterscheidet sich nicht von der im Stamm 2200 gefundenen.
Damit kann angenommen werden, daß die periodischen Schwankungen der Ribosomenverteilung keine für nur einen Hefestamm spezifische Erscheinung ist, sondern generell bei Saccharomyces-Zellen erwartet werden kann.

3.3.7 Versuche zu Funktion und turn-over

3.3.7.1 Korrelation von Ribosomenverteilung und Proteinbiosynthese

Nach den Ergebnissen der letzten Kapitel stellen sich besonders drei Fragen:

1] Welche Ursachen haben die periodischen Schwankungen der prozentualen Verteilung der Ribosomen im Zellzyklus ?

2] Gibt es eine Korrelation zwischen den Schwankungen der Proteinsyntheserate (s. 3.3.3) und denen der Ribosomenverteilung ?

3] Sind Rückschlüsse über den Ort der Proteinsynthese und die Existenz eines turn-over zwischen den Ribosomenarten möglich ?

Zur Klärung dieser Fragen werden erste Orientierungsversuche durchgeführt. Zunächst wird die Proteinsyntheserate parallel zur prozentualen Ribosomenverteilung während der ersten beiden Zellzyklen in Abhängigkeit von der Verdopplungszahl der Kultur gemessen.

Wie aus Abb. 14 ersichtlich, ist eine Korrelation zwischen Proteinsynthese und Ribosomenverteilung festzustellen. Maxima des prozentualen Anteils an membrangebundenen Ribosomen korrespondieren mit Maxima der Proteinsyntheserate. Die freien Ribosomen verhalten sich komplementär zu den membrangebundenen, d.h. in Phasen erhöhter Proteinsyntheseaktivität liegt ein Minimum des Anteils an freien Ribosomen vor.

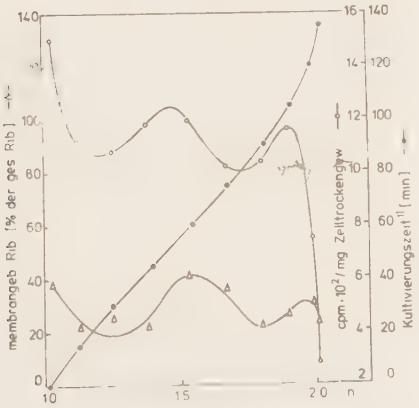

Abb. 14: Die prozentuale Verteilung der membrangebundenen Ribosomen im Vergleich zur Proteinsyntheserate (Aufnahme von ^{14}C-Aminosäuregemisch) während eines Zellzyklus; n = Verdopplungszahl.

Die Korrelation zwischen Proteinsynthese und Ribosomenverteilung spricht dafür, daß Proteinsynthese mit großer Wahrscheinlichkeit vorwiegend an einer Ribosomenart, nämlich den membrangebundenen Ribosomen, stattfindet. Aus dem komplementären Verhalten von freien und membrangebundenen Ribosomen kann darüber hinaus geschlossen werden, daß in der Proteinsynthese-aktiven Phase ein gerichteter turn-over, nämlich von freien zu membrangebundenen Ribosomen vorliegt.

Neuere Untersuchungen mit Hilfe von Aminosäure-^{14}C-Markierung der nascierenden Peptidketten von Kraft [24] haben bestätigt, daß bei Hefen die Proteinsynthese ganz überwiegend an membrangebundenen Ribosomen lokalisiert ist. Die freien Ribosomen könnten in diesem Fall einen Reservepool darstellen, der der Zelle erlaubt, kurzfristig ohne Neusynthese von Ribosomen Proteinsynthese zu starten.

3.3.7.2 Uracil-Markierung der Ribosomenfraktion

Weitere Orientierungsversuche zur Frage nach einem turn-over wurden mit Uracil-2-^{14}C-Markierungen der Ribosomenfraktionen durchgeführt. Wenn ein gerichteter turn-over zwischen den beiden Ribosomenarten vorliegt, ist bei Pulsmarkierung in verschiedenen Phasen des Zellzyklus eine entsprechende zeitliche Veränderung der spezifischen Radioaktivitäten in den Ribosomenfraktionen zu erwarten.

Die folgenden beiden Markierungsarten wurden durchgeführt:

1. Messung der Aktivitätsabnahme nach 48stündiger Uracil-2-^{14}C-Markierung.
2. Pulsmarkierung mit Uracil-2-^{14}C während der ersten beiden Verdopplungsperioden.

Zu (1):

Eine Hefekultur wurde 48 Stunden lang in Uracil-2-^{14}C kultiviert, dann in inaktives Medium überführt und mit einer Anfangs-OD von

0,08 weiter kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums wurde die spezifische Radioaktivität der Ribosomenfraktion ermittelt. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt. Das Ergebnis ist in Abb. 15 dargestellt.

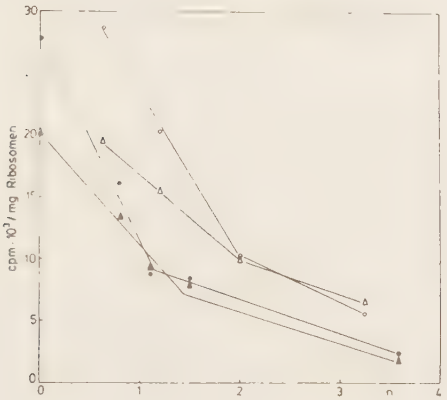

Abb. 15: Die Abnahme der spezifischen Uracil-2-^{14}C-Aktivität der freien (-●- -○-) und membrangebundenen (-▲- -△-) Ribosomen in Abhängigkeit von der Verdopplungszahl n der Zellkultur in Vollmedium ohne Uracil-2-^{14}C. Die Zellen wurden während der Kultivierung 48 h lang mit Uracil-2-^{14}C inkubiert, anschließend in "kaltem" Vollmedium weiterkultiviert und die spezifische Radioaktivität der Ribosomenfraktionen bei verschiedenen Phasen des Wachstums gemessen.
Ergebnisse von zwei Experimenten.

Die freien Ribosomen sind in der stationären Wachstumsphase (Anfangspunkt in Abb. 15) wesentlich höher markiert als die membrangebundenen Ribosomen. Für diesen Unterschied wurde bisher keine Erklärung gefunden. Nach drei bis vier Zellzyklen ist die spezifische Radioaktivität beider Fraktionen auf etwa den gleichen stationären Wert abgesunken. Die hier beobachtete Angleichung der spezifischen Aktivitäten beider Ribosomenfraktionen kann als Hinweis für einen turn-over angesehen werden.

Zu (2):

An verschiedenen Punkten des Wachstums (OD = 0,08; 0,125; 0,155; 0.175; Abb. 16) wurden Volumina mit gleichen Zellmengen 30 Minuten lang mit Uracil-2-^{14}C markiert und die spezifische Radioaktivität der Ribosomenfraktionen gemessen.

Abb. 16 a zeigt die spezifische Radioaktivität der Ribosomenfraktionen bezogen auf die Radioaktivität der Gesamtribosomen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit. Die Radioaktivität der membrangebundenen Ribosomen zeigt nach der ersten Zellmassenverdopplung ein Maximum. Ein korreliertes Minimum der freien Ribosomen ist nicht zu erkennen. Das ist damit zu erklären, daß der Gesamtribosomengehalt bis zum zweiten Meßpunkt noch ansteigt (Abb. 16b). Zeichnet man den absoluten Gehalt an freien Ribosomen auf, ist ein Minimum zu dem erwarteten Zeitpunkt andeutungsweise zu erkennen. Die Auftragung des prozentualen Anteils sowie der prozentualen Radioaktivität der membrangebundenen Ribosomen zeigt jeweils ein deutliches Maximum. Somit ist auch bei diesem Versuch ein komplementäres Verhalten der beiden Ribosomenarten zu erkennen und daher ein turn-over anzunehmen.

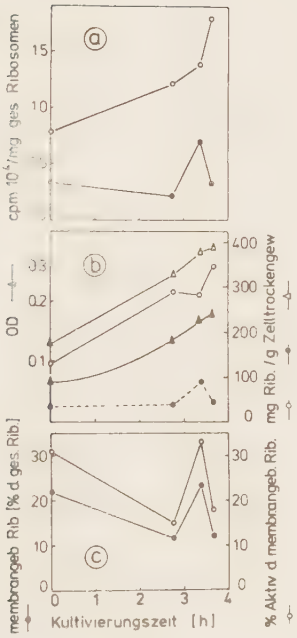

Abb. 16: Die spezifische Radioaktivität der membrangebundenen und freien Ribosomen nach Pulsmarkierung mit Uracil-2-^{14}C an verschiedenen Punkten des Wachstums, in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.
(a) Die Markierung der freien (—o—) und membrangebundenen (—●—) Ribosomen bezogen auf die Markierung des Gesamt-Ribosomengehaltes.
(b) Der absolute Gehalt an freien (—o—), membrangebundenen (—●—) und Gesamt-Ribosomen (—△—) in Bezug auf die Wachstumskurve (—▲—).
(c) Die prozentuale Verteilung und die prozentuale Radioaktivität der membrangebundenen Ribosomen (jeweils bezogen auf die Gesamt-Ribosomen).

3.4 Entwicklung und Diskussion eines turn-over-Modells für membrangebundene und freie Ribosomen in Saccharomyces

Ein Überblick über die wichtigsten Ergebnisse zur Funktion membrangebundener und freier Ribosomen zeigt:

1. Der Anteil an membrangebundenen bzw. freien Ribosomen zeigt in der log-Phase periodische Schwankungen, während der Gesamtribosomengehalt im wesentlichen konstant bleibt.
2. Ebenso werden in der Proteinbiosyntheserate während der log-Phase periodische Schwankungen gefunden.
3. Es ist eine Korrelation festzustellen zwischen Ribosomenverteilung und Proteinsyntheseaktivität, und zwar korrespondieren Maxima des Anteils an membrangebundenen Ribosomen mit Maxima der Proteinsyntheserate.
4. Aus dem komplementären Verhalten der Ribosomenarten in ihrer prozentualen Verteilung sowie der Korrelation zwischen Proteinsynthese und prozentualer Verteilung der membrangebundenen Ribosomen wird geschlossen, daß ein turn-over von den freien zu den membrangebundenen Ribosomen vorliegt, und daß Proteinsynthese überwiegend an membrangebundenen Ribosomen stattfindet. Diese Ergebnisse werden durch neuere Untersuchungen bestätigt [24]. Auf dieser Basis wird ein Modell für den turn-over entwickelt, das auf zusätzliche energieverbrauchende Mechanismen verzichtet, und daher unter evolutionären Gesichtspunkten günstig erscheint. Das Hauptgewicht wird auf die Mechanismen zur Bildung des Membran-Polysom-Komplexes gelegt. Im Gegensatz zu anderen Autoren [4, 29, 38] werden hierfür nur physikalische Prozesse vorgeschlagen.

Die Formation des Membran-Polysom-Komplexes wird als ein Zwei-Stufen-Prozeß angesehen: der Initiation und der Stabilisation. Für die Initiation sind zwei verschiedene physikalische Vorgänge denkbar:

Diffusion oder eine gerichtete intrazelluläre Strömung wie z.B. die Cytoplasmaströmung. Damit solche Mechanismen als Induktionsfaktoren für die Bildung eines Membran-Polysom-Komplexes wirksam werden können, müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

1. Es müssen Bindungsstellen für Ribosomen an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums existieren, was allgemein angenommen wird.
2. Die Diffusionsgeschwindigkeit v_d oder die Strömungsgeschwindigkeit v_s muß größer sein als die Wanderungsgeschwindigkeit v_{mr} während der Proteinsynthese zwischen mRNS und polysomalen Ribosomen überschreiten. Die Geschwindigkeit v_{mr} ist bestimmt durch die Peptidknüpfungsrate, die etwa 5 000 Peptidbindungen pro Minute beträgt [18] und die Triplettlänge (ca. 20 Å). Daraus ergibt sich für v_{mr} 0,16 μ/s. Demnach können Diffusion oder Cytoplasmaströmung als Induktionsfaktoren für die Membran-Polysom-Komplex-Formation fungieren, wenn die Bedingungen

$$v_d > 0,16\ \mu/s \qquad (1)$$

bzw.

$$v_s > 0,61\ \mu/s \qquad (2)$$

erfüllt sind.

Die mittlere Geschwindigkeit der Diffusion eines freien Ribosoms v_{dFR} kann mit Hilfe der Beziehung $D = kT / f$ abgeschätzt werden, wobei D die Diffusionskonstante, f der Reibungskoeffizient, T die absolute Temperatur und k die Boltzmann Konstante ist. Nimmt man als Ribosom ein kugelförmiges Partikel mit einem Radius von 100 Å und eine Cytoplasma-Viskosität von 10 Centipoise an [19], kommt man zu einer Abschätzung von $v_{dFR} \sim 1,5\ \mu/s$. Da der Reibungskoeffizient eines Polysoms mindestens linear mit der Anzahl seiner Ribosomen ansteigt, ergibt sich für ein Polysom mit 10 Ribosomen eine Diffusionsgeschwin-

digkeit $v_{dpol} \sim 0,15\ \mu/s$. Da diese Geschwindigkeit nur im Bereich der Relativgeschwindigkeit v_{mr} der mRNS liegt, dürfte die Diffusion zur Initiation eines Membran-Polysom-Komplexes nicht ausreichen.

Die in Pflanzenzellen beobachtete Geschwindigkeit der Cytoplasmaströmung reicht von 2 bis 100 μ/s [23, 44]. Obwohl bisher keine Beobachtungen über Cytoplasmaströmung in Hefezellen vorliegen, wird in Pilzen generell eine Cytoplasmaströmung angenommen [41]. Selbst, wenn man die niedrigste gemessene Geschwindigkeit von $v_s = 2\ \mu/s$ annimmt, ist die zweite Bedingung (S. 53) erfüllt.

Auf der Grundlage dieser Überlegungen wird das folgende Modell vorgeschlagen (Abb. 17):

Neusynthetisierte mRNS wird vom Kern möglicherweise durch das Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert und durch eine Membranpore[1] in das Cytoplasma geschleust. Sobald das 5'-Ende das Cytoplasma erreicht hat, werden Ribosomen assoziiert und die Proteinsynthese gestartet. Dabei kann sich die mRNS partiell noch im Lumen des endoplasmatischen Retikulums befinden. Während dieses Prozesses drückt der Cytoplasmastrom aufgrund von Reibungskräften F_f das Polysom an die Membran, so daß eine lose Aggregation zwischen Membran und Polysom entsteht (Abb. 17a). In diesem Augenblick werden die Membran-Ribosomenbindungen an den entsprechenden "sites" geknüpft. Dadurch wird der Komplex stabilisiert.

Dieser Zustand (Abb. 17b) ist unter der Bedingung thermodynamisch stabil, daß der Gewinn an Bindungsenergie ΔU aus der Formation des Membran-Polysom-Komplexes größer ist als der entropische

---

[1] Analog zu den Kernporen wurden im endoplasmatischen Retikulum von Saccharomyces Poren gleicher Größe (80-100 nm) beobachtet [35], die als dynamische Strukturen aufzufassen sind, d.h. die an verschiedenen Stellen der Membran vorübergehend entstehen können [33].

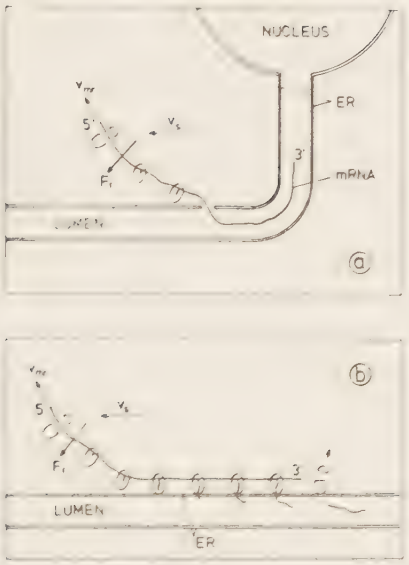

Abb. 17: Die Bildung des Membran-Polysomen-Komplexes.

(a) Initiation: neusynthetisierte mRNS wird durch das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert und gelangt durch eine Pore mit dem 5'-Ende in das Cytoplasma. Während der Assoziation von Ribosomen wird das entstehende Polysom durch Cytoplasmaströmung aufgrund von Reibungskräften F_f zur Membran gedrückt. Die Geschwindigkeit der Cytoplasmaströmung ist v_s, die " Relativgeschwindigkeit " zwischen mRNS und Ribosomen während der Proteinsynthese ist v_{mr}.

(b) Der stabilisierte Zustand des Membran-Polysom-Komplexes: Sobald eine lose Aggregation zwischen Polysom und Membran entstanden ist, werden die Ribosomen-Membran-Bindungen geknüpft und damit der Komplex stabilisiert. Die in das Lumen des ER ragenden nazierenden Polypeptidketten können zur Stabilisierung beitragen. Das mRNS-5'-Ende bewegt sich tendenziell zum Cytoplasma hin und ermöglicht so die erneute Assoziation freier Ribosomen. Nach beendeter Synthese kann das Protein durch das Lumen transportiert und die Ribosomen von der Membran abgelöst werden.

Energiebeitrag $\Delta S T$ bei dem Übergang vom freien in den gebundenen Zustand, so daß die Freie Energie im gebundenen Zustand minimal wird. Dies kann als richtig angenommen werden, weil sowohl die freien als auch die membrangebundenen Polysomen weitgehend gestreckt vorliegen [56] und daher $\Delta S T$ gegenüber ΔU vernachlässigbar ist.

Der stabilisierte Membran-Polysom-Komplex ist als dynamischer Gleichgewichtszustand zu verstehen, der gekennzeichnet ist durch eine permanente Konkurrenz zwischen Bewegungen des mRNS-5-Endes zur Membran hin und von der Membran weg. Da keine direkte Bindung zwischen mRNS und Membran angenommen wird, tendiert das 5'-Ende dazu, sich mit größerer Wahrscheinlichkeit in Richtung Cytoplasma als entlang der Membran zu bewegen. Diese Bewegung ermöglicht die erneute Assoziation freier Ribosomen. Gleichzeitig wird das freie Polysomenende jedoch vom Cytoplasmastrom zurück an die Membran gedrückt, so daß wieder eine Aggregation und schließlich eine Bindung zwischen Membran und Ribosomen zustande kommt.

Die naszierenden Polypeptidketten können - möglicherweise ebenfalls durch Poren - in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums gelangen und dadurch die Bindung des Polysoms an die Membran noch verstärken (wie von verschiedenen Autoren vorgeschlagen, z.B. [13]). Schließlich können die neusynthetisierten Proteine durch das Lumen transportiert werden. Dies wäre nicht nur für extrazelluläre - wie bisher von vielen Autoren angenommen - sondern auch für intrazelluläre Proteine eine sinnvolle Transportmöglichkeit.
Übereinstimmend mit anderen Autoren wird auch hier angenommen, daß nach Beendigung der Proteinsynthese die Ribosomen in ihre Untereinheiten dissoziieren und von der Membran abgelöst werden können.

Auf der Grundlage des vorgeschlagenen Modells können einige Ergebnisse über freie und membrangebundene Ribosomen wie folgt diskutiert werden:

1] Die hohe Anzahl freier Ribosomen, die in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, sowie das Ergebnis, daß Proteinsynthese überwiegend an membrangebundenen Ribosomen stattfindet, sind erklärbar, wenn man die freien Ribosomen als Reservepool versteht, der der Zelle im Bedarfsfall eine schnelle Erhöhung der Proteinsyntheserate ermöglicht. Aufgrund des geringen Anteils an endoplasmatischem Retikulum in Hefen [28] muß eine hohe turnover Rate von freien zu membrangebundenen Ribosomen angenommen werden.

2] Verschiedene Autoren finden Proteinsynthese sowohl an freien als auch an membrangebundenen Ribosomen und postulieren zwei verschiedene Typen von Ribosomen [3, 8, 20, 35, 46, 51; Zusammenfassung s. 38]. In dem beschriebenen Modell ist Proteinsynthese prinzipiell an beiden Ribosomenarten möglich, d.h. die Membranbindung ist zwar günstig, aber nicht essentiell für die Proteinsynthese. Ob an freien oder membrangebundenen Ribosomen synthetisiert wird, wird lediglich durch die Konkurrenz zwischen den beiden Geschwindigkeiten v_s und v_{mr} gesteuert.

3] Die meisten Untersuchungen in der Literatur ergeben keine biochemischen oder biophysikalischen Unterschiede der beiden Ribosomenarten [7, 10, 17, 21, 38]. Das unterstützt die Überlegungen von Punkt [2].

4] Brañes [4] hat neusynthetisierte mRNS in Membranfraktionen ("membranes") gefunden. Dieses Ergebnis kann auch dahingehend interpretiert werden, daß die neusynthetisierte mRNS - wie hier vorgeschlagen - vom Kern durch das Lumen des endoplasmatischen Retikulums zum Cytoplasma transportiert wird.

5] Verschiedentlich sind "lose" von "fest" gebundenen Ribosomen unterschieden worden [39]. "Lose" gebundene Ribosomen konnten durch milde RNase Behandlung, "fest" gebundene Ribosomen hingegen nur mit Detergentien von den Membranen abgelöst werden. Nach dem vorliegenden Modell sind die Polysomen nur partiell an die Membranen gebunden, so daß mit RNase-Behandlung das freie Ende abgelöst wird, während der gebundene Anteil des Polysoms an der Membran zurückbleibt.

Obwohl in dem vorliegenden Modell für die Initiation der Membran-Polysom-Komplex-Formation ein direkter Regulationsmechanismus nicht essentiell ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß derartige Mechanismen in höheren Eukaryonten vorkommen wie es z.B. Blobel in seiner "signal-Hypothese" am Beispiel von Rattenleber vorgeschlagen hat [1].
Die Möglichkeit einer ausschließlich physikalisch induzierten Formation des Membran-Polysom-Komplexes ist bisher in der Literatur nicht diskutiert worden. Aus der Diskussion ging jedoch hervor, daß der Cytoplasmastrom berücksichtigt werden muß und möglicherweise der wichtigste Induktionsfaktor zur Komplexbindung ist.

4. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Isolierung von membrangebundenen und freien Ribosomen entwickelt, welche orientierende Vergleiche zur Funktion der freien und membrangebundenen Ribosomen erlaubt. Es wurden die prozentuale Verteilung der beiden Ribosomenarten sowie die Protein- und RNS-Syntheseraten in Abhängigkeit von der Zellmassenverdopplung synchron wachsenden Kulturen gemessen. Es wurde gezeigt, daß die Güte der Synchronisation anhand typischer periodischer Schwankungen der Proteinsyntheserate geprüft werden kann. Pro Zellzyklus wurden mindestens zwei Maxima der Proteinsyntheserate gefunden. Ein differenzierteres Verhalten der Proteinsyntheseaktivität während des Zellzyklus war andeutungsweise zu erkennen.

Die prozentuale Verteilung der beiden Ribosomenarten zeigte ebenfalls periodische Schwankungen während des Wachstums. Insbesondere wurde ein komplementäres Verhalten der Anteile an membrangebundenen und freien Ribosomen gefunden. Daraus wird auf einen turnover zwischen den beiden Ribosomenarten geschlossen. Darüber hinaus korrellieren Maxima der Proteinsyntheserate mit Maxima des prozentualen Anteils an membrangebundenen Ribosomen. Dies ist ein Hinweis darauf, daß Proteinsynthese überwiegend an membrangebundenen Ribosomen stattfindet.

Das auf der Grundlage dieser Ergebnisse entwickelte Modell konzentriert sich auf die Formation des Membran-Polysom-Komplexes, welche in zwei Schritten erfolgt: [1] der Cytoplasmastrom induziert infolge von Reibungskräften eine lose Aggregation zwischen Polysomen und Membran. [2] Durch die Bindung der Ribosomen an die Membran wird der Membran-Polysom-Komplex stabilisiert. Dieses Modell verzichtet auf turn-over spezifische Regulationsmechanismen und stützt

sich stattdessen ausschließlich auf physikalische Ursachen. Deshalb erscheint es insbesondere unter evolutionären Gesichtspunkten günstig.

5. LITERATUR

1] Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975). J. Cell Biol. 67, 835

2] Blobel, G. und van Potter, R. (1967). J. Mol. Biol. 26, 279

3] [illegible]oemendal, H., Ber[illegible]ti, E. L. und Bont, W. S. (1974). In " Methods in Enzymology", Vol. XXX, pp. 313-327 (Moldave, K. und Grossman, L., ed.)

4] Brañes, L. und Pogo, A. O. (1975). Eur. J. Biochem. 54, 317

5] Burn[illegible] Hall, D. G. und [illegible]ch, W. A. O'N. (1967). Biometrics 23, 693

6] [illegible]pnell, P. N. und Blobel, G. (1976). FEBS Letters 72, 215

7] Campbell, P. N. und von der Decken, A. (1974). In " The Cell in Medical Science", Vol. 1, pp. 143-181 (Beck, F. und Lloyd, J. B., ed.) Academic Press, London-New York

8] Campbell, P. N., [illegible]rck-Haussen, G. und Lowe, E. (1965). Biochem. J. 97, [illegible]

9] Carter, B. L. A., Sc[illegible]tian, J. und Halvorson, H. O. (1971). Advan. Enzyme Regulation 9, 253

10] Christman, J. K. und Goldstein, J. (1970). Biochim. biophys. Acta 217, 346

11] Cook, J. R. und James, T. W. (1964). In " Synchrony in Cell Division and Growth", pp. 485-495. (Zeuthen, E., ed.) Interscience Publishers Inc., New York

12] Dieminger, L. (1973). Z. Naturforschg. 28c, 72

13] Eckstein, H., Paduch, V. und Hilz, H. (1966). Biochem. Z. 344, 435

14] Engelberg, B. (1964). Expl. Cell Res. 36, 647

15] Gorman, J., Tauro, P., La Berge, M. und Halvorson, H. (1964). Biochem. biophys. Res. Commun. 15, 43

16] Halvorson, H. O., Kaback, D., Sogin, S., Sajdel-Sulkowska, E. M. und Takano, J. (1974). Can. J. Genet. Cytol. 16, 751

17] Hanna, N., Bellemare, G. und Godin, C. (1973). Biochim. biophys. Acta 331, 141

18] Harbers, E. (1975). In " Nukleinsäuren", pp. 191-207, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

19] Heilbrunn, C. V. (1958). Protoplasmatologia II, c1 ,1

20] Howatson, A. F. und Ham, A. W. (1955). Cancer Res. 15, 62

21] Hulse, J. L. und Wettstein, F. O. (1972). Biochim. biophys. Acta 269, 265

22] Jeschke, H., pers. Mitteilung

23] Kamiya, N. (1959). Protoplasmatologia VIII, 3a, 1

24] Kraft-Creech, J. und Lochmann, E.-R. (1977), Biochim.biophys. Acta, im Druck

25] Laskowski, W. (1960). Z.Naturforschg. 15b, 495

26] Lengyel, P. und Söll, D. (1969). Bact.Rev.

27] Lother, H. (1977). Dissertation, Freie Universität Berlin

28] Matile, P., Moor, H. und Robinow, C.F. (1969). In "The Yeasts", Vol. 1, pp.219-302. (Rose, A.H. und Harrison, J.S., ed.), Academic Press, London, New York

29] Mechler, B. und Vassalli, T. (1975). J.Cell Biol. 67, 1-37

30] Micheler, A. (1972). Dissertation, Freie Universität Berlin

31] Mitchison, J.M. (1971). "The Biology of the Cell Cycle", Cambridge University Press

32] Mitchison, J.M. (1958). Expl.Cell Res. 15, 214

33] Moor, H. und Mühlethaler, K. (1963). J. Cell Biol. 17, 609

34] Palade, G.E. und Siekevitz, P. (1956). J.Biophys.Biochem.Cytol. 2, 171

35] Palade, G.E. und Siekevitz, P. (1956). Proc.Natl.Acad.Sci.US 63, 1370

36] Randall, L.L. und Hardy, J.S. (1977). Eur.J.Biochem. 75, 43

37] Reichert, U. (1969). Dissertation, Freie Universität Berlin

38] Rolleston, F.S. (1974). Sub-Cell.Biochem. 3, 91

39] Rosbash, M. und Penman, S. (1971). J.Mol.Biol. 59, 227 und 243

40] Sabatini, D., Borgese, N., Adelman, M., Kreibich, G. und Blobel, G. (1972). Fed.Eur.Biochem.Soc.Proc. of the 8. Meeting, Amsterdam, Abstracts Nr. 463

41] Schlegel, H.G. (1972). In "Allgemeine Mikrobiologie", pp.124-146, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

42] Schneider, E., Lochmann, E.-R. und Lother, H. (1976). Biochim. biophys.Acta. 432, 92

43] Schulz-Harder, B. und Lochmann, E.-R. (1976). Z.Naturforschg. 31c, 169

44] Schumacher, W. (1962). In "Lehrbuch der Botanik", pp.16-22 und 344-345, (Strasburger E. et al., ed.), G. Fischer Verlag, Stuttgart

45] Scopes, A.W. und Williamson, D.H. (1964). Expl. Cell Res. 35, 361

46] Siekevitz, P. und Palade, G.E. (1960). J.biophys.biochem.Cytol. 7, 619

47] Slautterback, D.B. und Fawcett, D.W. (1959). J.biophys.biochem. Cytol. 5, 441

48] Sogin, S.J., Carter, B.L.A. und Halvorson, H.O. (1974). Exptl. Cell Res. 89, 127

49] Takagi, M. und Hoagland, M.B. (1975). J.Biochem. 78, 1225

50] [illegible]ori, Y., Lo[illegible]ann, E.-R. und Laskowski, W. (1966). Z.Naturforschg. 21b, 960

51] Tata, J.R. (1971). Sub-Cell.Biochem. 1, 83

52] Uttech, K. (1972). Dis[illegible]ion, Freie Universität Berlin

53] Weber, H.J. (1972). Mo[illegible]ec.gen.Genet. 119, 233

54] W[illegible]on, D.[illegible] und Scopes, A.W. (1961). J.Inst.Brew. 67, 39

55] Wittmann, H.-G. (1976). Eur.J.Biochem. 61, 1

56] Wittmann, H.-G. (1976). Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft, pp. 19-39

57] Zamecnik, P.C [illegible]1960). Harvey Lectures 54, 256

Für vielfältige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich Heinz Lother, Ingrid Pietsch, Astrid Micheler, Andrea Rudolph, Petra Reichert und den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie.
Ganz besonders danke ich Randolf Lochmann und Edwin Boroske für viele anregende und hilfreiche Diskussionen.

Lebenslauf

5.3.1943	in Berlin geboren als Tochter des Physikers Dr. Julius Schneider und seiner Ehefrau Ferdinande, geb. Gocke
1949 - 1963	Schulbesuch in Berlin, Abitur an der Erich-Hoepner-Schule
1963 - 1965	Ausbildung mit Abschluß Staatsexamen zur medizinisch-technischen Assistentin am Lette-Verein Berlin
1965 - 1967	Berufstätigkeit als medizinisch-technische Assistentin an der FU und TU Berlin
1967 - 1972	Studium der Biologie an der Freien Universität Berlin
1971	im Rahmen der Anfertigung der Diplomarbeit Studienaufenthalte in Prag (als EMBO-Stipendiatin) und Paris
1972	Abschluß des Hauptstudiums mit dem Diplom (Thema der Diplomarbeit: " Untersuchungen zum Purintransport: Lokalisation von Rezeptormolekülen für Purinbasen an der Oberfläche von Saccharomyces-Zellen ")
seit 1973	Wissenschaftliche Assistentin (TZA) am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, seit dessen Auflösung 1976 am Fachbereich Biologie der FU Berlin. Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Molekularbiologie (ehem. Haus 5 des Zentralinstituts für Biochemie und Biophysik) im Fachbereich Biologie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E.-R. Lochmann angefertigt.